

Aus dem Bereich Klinische Medizin der
Medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Immunantwort auf autologe und heterologe Antigene von *Helicobacter pylori* beim Menschen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2006

vorgelegt von: Benjamin Jakob
geb. am 12.11.1972 in Ludwigshafen

Inhaltsverzeichnis

0. Zusammenfassung	4
Abstract	6
1. Einleitung	
1.1. Epidemiologie	8
1.2. Bakteriologie	9
1.3. Pathogenese der Entzündung	
1.3.1. Akute Phase	10
1.3.2. Chronische Phase	11
1.4. Pathologie der Helicobacter-Krankheiten	12
1.5. Genetische Variabilität von H. pylori	13
1.6. Bisherige Untersuchungen zur Immunreaktion auf H. pylori in vitro	
1.6.1. Methodik	13
1.6.2. Charakterisierung der Immunantwort auf mononukleäre Zellen	14
1.6.3. Kreuzreagibilität	16
1.6.4. Hinweise auf immunmodulierende Effekte bei der H. pylori-Infektion	16
1.7. Problemstellung	17
2. Material und Methoden	
2.1. Patienten	19
2.2. Material	19
2.3. Methoden	
2.3.1. Anzucht der autologen H. pylori-Stämme	22
2.3.2. Isolation von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut	24
2.3.3. Stimulation von PBMZ mit autologen und heterologen H. pylori-Sonikaten	24
2.4. Messverfahren	
2.4.1. Bestimmung von IL-10 im Kulturüberstand	25
2.4.2. Messung der Proliferation (DNA-Synthese) von PBMZ	25
2.4.3. Flowzytometrie	26

2.5. Statistische Auswertung	28
3. Ergebnisse	
3.1. Proliferation von PBMZ nach Stimulation durch H. pylori-Sonikat	29
3.2. Expression von Aktivierungsmarkern	30
3.3. IL-10-Produktion	32
4. Diskussion	34
5. Literaturverzeichnis	44
6. Publikation und Dank	54
7. Curriculum vitae	55

0. Zusammenfassung

Beim Menschen führt eine Besiedelung des Magens mit dem Spirochäten *Helicobacter pylori* zu einer chronischen Infektion, die in der Regel lebenslang persistiert, wenn sie nicht durch medikamentöse Therapie behandelt wird. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der gastroduodenalen Ulkuserkrankung und ist mit der Entstehung von B-Zell-Lymphomen des Magens assoziiert.

Die Infiltration der Magenmukosa mit Granulozyten, Makrophagen und antigenspezifischen Lymphozyten sowie der Nachweis spezifischer Antikörper im Serum und Magensaft des Patienten zeigen die Induktion einer polyvalenten Immunantwort an. Dennoch ist diese in der Regel nicht ausreichend, um den Erreger zu eliminieren.

Es wird daher nach Prinzipien gesucht, die die Immunreaktionen auf die kolonisierenden Bakterien abschwächen. Bisherige Experimente zur Reaktion mononukleärer Zellen auf eine Stimulation durch *Helicobacter pylori* in vitro haben gezeigt, dass die Immunantwort bei Personen, die mit *Helicobacter* infiziert sind, geringer ausfällt als bei nicht infizierten Kontrollpersonen.

Wir stellten daher die Hypothese auf, dass immunologische Mechanismen existieren könnten, die die Entzündungsreaktion modulieren und damit die Persistenz des Erregers begünstigen. Da die genetische Variabilität von *Helicobacter pylori* hoch ist, müssten solche Anpassungsvorgänge im Immunsystem eines Patienten spezifisch für den infizierenden Stamm dieses Individuums, den autologen Stamm, ausgebildet werden.

Daher wurde in der hier vorgelegten Arbeit erstmals die Immunreaktion mononukleärer Zellen des peripheren Blutes auf den autologen Stamm vom Patienten selbst und auf heterologe Stämme von anderen Patienten verglichen.

Zur Charakterisierung der Immunantwort wurden die Zellen in vitro mit Bakterien-Präparationen inkubiert, die von verschiedenen Patienten isoliert und kultiviert worden waren. Als Maß für die stimulatorische Wirkung dienten die Proliferationsrate der Zellen sowie die Expression von Oberflächenmarkern, die die Aktivierung von T-Zell-Populationen anzeigen wie der Interleukin-2-Rezeptor, der Transferrin-Rezeptor und HLA-DR. Da Zytokine bei der Steuerung von inflammatorischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielen, wurde die Synthese von Interleukin-10 gemessen, das inhibitorische Wirkung auf die Immunreaktion zeigt.

Es ließ sich nachweisen, dass sowohl autologe als auch heterologe *Helicobacter*-Stämme eine deutliche Immunreaktion bei mononukleären Zellen hervorriefen. Es war jedoch zu beobachten, dass die Proliferationsantwort bei autologer Stimulation signifikant schwächer ausfiel als bei heterologer. Die Expression von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche war nach Stimulation deutlich vermehrt. Signifikante Unterschiede zwischen autologer und heterologer Stimulation ergaben sich hier jedoch nicht. Dies könnte auf den im peripheren Blut zu geringen Anteil *Helicobacter*-spezifischer T-Zellen zurückzuführen sein. Die Sekretion von Interleukin-10 in den Kulturüberstand der stimulierten Zellen war bei autologer Stimulation deutlich stärker als bei Inkubation mit einem heterologen *Helicobacter*-Stamm.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Reaktion mononukleärer Zellen auf *Helicobacter pylori* spezifisch für den autologen Stamm einer infizierten Person vermindert ist. Möglicherweise trägt die beobachtete vermehrte Sekretion von Interleukin-10 zu dieser Modulation bei. Eine stamm- bzw. antigen-spezifische Herab-Regulation der Immunantwort könnte einen Mechanismus darstellen, der die Persistenz des Erregers im Menschen erklärt.

Abstract

Immune response to autologous and heterologous *Helicobacter pylori* antigens in humans

Colonization of the human stomach with the spiral bacterium *Helicobacter pylori* induces a chronic infection which persists for life if not treated with effective antibiotic drugs. It also plays an important role in the pathogenesis of gastroduodenal ulcer disease and is associated with the development of B cell lymphomas of the gastric mucosa.

Infection results in the infiltration of the gastric mucosa with granulocytes, monocytes, and antigen specific lymphocytes as well as the detection of specific antibodies in the serum and gastric juice of infected patients. Despite of this broad spectrum of immune reactions, the pathogen is usually not eliminated.

Therefore, there is a search for immunomodulating mechanisms which are able to suppress the immune reactions towards colonizing bacteria. Until now, experimental data has shown that in vitro stimulation of mononuclear cells by *Helicobacter pylori* results in a less stronger activation and proliferation in infected subjects than in non-infected individuals.

We hypothesized that the immunologic mechanisms which are responsible for the down-regulation of the immune reaction and persistence of the bacteria have developed specifically for the infecting strain, which is called the autologous strain, in every individual patient. As genetic variability is very high between different strains, we compared the immune reaction of peripheral blood mononuclear cells in response to autologous bacteria from the patient himself and heterologous strains isolated from other patients.

For the characterization of immune reactions in vitro we co-cultured mononuclear cells with bacterial preparations isolated and cultivated from different patients. The stimulatory effects were measured by cell proliferation, expression of T cell surface activation markers like the interleukin-2-receptor, the transferrin-receptor, or HLA-DR. As cytokines play an important role in the regulation of inflammatory reactions, we also measured interleukin-10 in culture supernatants, which is known to have inhibitory effects on lymphocyte stimulation.

We could show that autologous as well as heterologous sonicated *Helicobacter* bacteria both induced an immune reaction in mononuclear cells but proliferative response was markedly and significantly decreased after autologous stimulation. The expression of surface activation markers on T cells was increased after both stimulations compared to cells cultured in medium alone without addition of antigens but autologous and heterologous stimulation did not differ significantly in these measurements. This could be due to the low number of *Helicobacter* specific T cells in peripheral blood. Secretion of interleukin-10 was much higher after stimulation with autologous than with heterologous *Helicobacter* strains.

Our results show that mononuclear cell responses to *Helicobacter pylori* antigens in vitro are strain dependent and diminished when induced by the autologous bacterial strain of an infected patient. This modulation could be mediated by an increased secretion of interleukin-10 by T lymphocytes. Strain specific down regulation of immune responses could be one of the mechanisms that enable persistence of *Helicobacter pylori* in man.

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Die Infektion des menschlichen Magens mit dem spiralförmigen Bakterium *Helicobacter pylori* gehört zu den am weitesten verbreiteten Infektionskrankheiten weltweit. Die Prävalenz dieser Infektion wird auf ca. 50% der Weltbevölkerung geschätzt, wobei sowohl regional als auch innerhalb einer Bevölkerungsgruppe Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit des Vorkommens bestehen. So wird beispielsweise in den Entwicklungsländern eine höhere Durchseuchungsrate als in den Industrienationen beobachtet (Eurogast-Study-Group, 1993). Serologische Querschnittsuntersuchungen, welche die Häufigkeit der *H. pylori*-Infektion durch Nachweis von Antikörpern im Blut von Probanden untersuchen, zeigen für verschiedene Regionen jeweils einen Anstieg der Prävalenz mit zunehmendem Lebensalter. In mehreren Untersuchungen wurde dieser Anstieg mit ca. 1% pro Lebensjahr beziffert (Sitas, 1991). Es ist jedoch davon auszugehen, dass es sich hierbei um einen Klasseneffekt handelt, da prospektive Untersuchungen gezeigt haben, dass die Infektion in der Regel in der Kindheit und hier häufig durch intrafamiliäre Kontakte erworben wird, wobei sozioökonomische Faktoren eine entscheidende Rolle spielen (Thomas, 1990; Webb, 1994). Hingegen scheint das Neuauftreten von *Helicobacter*-Antikörpern in späteren Lebensjahren eher selten zu sein. Die höhere Infektionsrate älterer Generationen innerhalb einer Population wird daher durch ein erhöhtes Übertragungsrisiko aufgrund der Lebensumstände in der Kindheit erklärt.

Das natürliche Erregerreservoir von *Helicobacter pylori* ist hauptsächlich der menschliche Magen. Zuweilen finden sich Erreger auch auf gastralen Metaplasien des übrigen Verdauungstraktes, beispielsweise im Duodenum und im Ösophagus. Außerhalb der menschlichen Spezies wurde *H. pylori* auch bei Affen nachgewiesen. Zum Übertragungsweg von Mensch zu Mensch existieren bisher noch keine gesicherten Erkenntnisse. Sowohl die fäkal-orale als auch die oral-orale Transmission erscheinen möglich. Zum Nachweis des Erregers im Stuhl oder Speichel gibt es jedoch widersprüchliche Befunde (Mapstone, 1993; van Zwet, 1994). Mit Nachweisverfahren der zweiten Generation können *Helicobacter*-Antigene im Stuhl von Patienten mittels ELISA nachgewiesen werden. Legt man die

kombinierte Anwendung der bisherigen Standardverfahren in der Infektionsdiagnostik zugrunde (die kulturelle Anzüchtung aus Magenbiopsien, die histologische Diagnostik mithilfe der Warthin-Starry-Färbung, den Urease-Test mit Biopsiematerial oder den nicht-invasiven C13-Harnstoff-Atemtest), so erwies sich die diagnostische Zuverlässigkeit der Stuhltestung in einigen Studien jedoch als unzureichend, weshalb dieses Verfahren bisher keinen Eingang in die Routinediagnostik gefunden hat. (Aguemon, 2004; Asfeldt, 2004; Calvet, 2004; Kato, 2004; Syam, 2005)

1.2 Bakteriologie

Die Stoffwechseleigenschaften des Bakteriums versetzen es in die Lage, das besondere Milieu des Magens zu kolonisieren. Azidität, Schleimauskleidung und Peristaltik sorgen hier normalerweise für keimarme Verhältnisse. Eine residente bakterielle Flora, wie sie beispielsweise im unteren Gastrointestinaltrakt in quantitativ großem Umfang und hoher Diversität der Keime zu finden ist, existiert im Magen nicht. Im sauren Magensaft sind vegetative Formen von Mikroorganismen in der Regel nicht lebensfähig. Der von den gastralen Nebenzellen gebildete Schleim und die propulsive Peristaltik erschweren die Ansiedelung von aus dem Oropharynx deszendierenden oder mit der Nahrung aufgenommenen Keimen. Auch *Helicobacter pylori* ist ein säure-labiles Bakterium. Besondere Eigenschaften in Struktur und Stoffwechsel ermöglichen es ihm jedoch, sich dem bakteriziden Milieu zu entziehen. Diese stellen daher Pathogenitätsfaktoren für die Etablierung einer Infektion dar.

Das markanteste Merkmal von *H. pylori* ist die Produktion großer Mengen Urease. Dieses membranständige Enzym katalysiert die Spaltung von Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid und hat für das Überleben von *H. pylori* im Magen eine herausragende Bedeutung, da der entstehende Ammoniak die sauren Valenzen des Magensaftes in der unmittelbaren Umgebung des Keims zu neutralisieren vermag. Im Tiermodell konnte durch Inaktivierung der Urease-Gene gezeigt werden, dass die Aktivität des Enzyms eine essentielle Voraussetzung zur Kolonisation des Magens darstellt (Ferrero, 1992). Ihre Begeißelung, durch die die Bakterien eine hohe Motilität auch in visköser Umgebung erlangen, erleichtert dem Erreger das Eindringen in die vor Säure geschützte Zone unmittelbar über der Epithelschicht (Geis, 1989). Ferner wurden zelluläre Membranstrukturen beschrieben, die eine Adhärenz an Magenepithelzellen ermöglichen (Segal, 1996).

Die eigentliche pathogene Wirkung der *H. pylori*-Infektion auf die Magenmukosa wird zum großen Teil durch einen Faktor vermittelt, der von den Bakterien aktiv sezerniert wird. Dieses Protein führt in Magenepithelzellen zur Störung der intrazellulären Membranbildung, wodurch in den geschädigten Zellen Vakuolen sichtbar werden. Es wurde daher vakuolisierendes Zytotoxin (VacA) bezeichnet. Obgleich bei allen *H. pylori*-Stämmen das kodierende Gen *vacA* nachweisbar ist, wird das Protein nur bei einem Teil davon exprimiert. VacA erscheint als ein wesentlicher Pathogenitätsfaktor, da sein Auftreten mit schwereren klinischen Verlaufsformen der *H. pylori*-Infektion, wie z.B. der gastroduodenalen Ulcuskrankheit, assoziiert ist (Telford, 1994).

Eine ganze Gruppe von Genen, deren Produkte für eine erhöhte Pathogenität von *H. pylori* ursächlich zu sein scheinen, ist in der sog. CagA-CagII-Pathogenitätsinsel zusammengefasst. Als Expressionsmarker dieser Gruppe wird das stark immunogene 128 kDa-Protein CagA verwendet, dessen Funktion selbst noch nicht bekannt ist. Es existiert eine statistische Korrelation zwischen der Expression des CagA-Proteins und der Sekretion von VacA-Toxin (Covacci, 1993). Weitere Gene der *cagA*-Gruppe (*picA* und *picB*) sind beispielsweise mit der Induktion der entzündlichen Reaktion in der Magenmukosa verknüpft.

Wie jedes gram-negative Bakterium trägt auch *H. pylori* in seiner äußeren Membran ein Lipopolysaccharid (LPS), das als Endotoxin eine akute Entzündungsreaktion im Wirtsorganismus hervorrufen kann, welche durch Freisetzung von unter anderem Interleukin-1 oder Tumor-Nekrose-Faktor aus Makrophagen vermittelt wird. Diese Wirkung, welche bei anderen Bakterien, z.B. im Rahmen einer gram-negativen Sepsis, zum schweren Krankheitsbild eines Endotoxinschocks führen kann, ist bei *H. pylori* aufgrund der speziellen Zusammensetzung der Lipid-A-Komponente vermindert (Geis, 1990; Birkholz, 1993a). Die abgeschwächte Wirkung könnte daher die Entwicklung einer chronifizierenden, klinisch silenten Infektion begünstigen.

1.3 Pathogenese der Entzündung

1.3.1 Akute Phase

Die Kolonisation mit *H. pylori* löst eine lokale Entzündungsreaktion in der Magenmukosa aus. In der akuten Phase kommt es zunächst zur Einwanderung neutrophiler Granulozyten in die Mucosa, die durch die Expression von Integrinen auf

der Oberfläche der Leukozyten vermittelt wird. Diese Adhäsionsmoleküle binden an Rezeptoren auf den Endothelien (z.B. ICAM-1), was die Granulozyten zur Migration aus den Kapillaren in das Gewebe veranlasst (Yoshida, 1993).

Bakterielle Faktoren wie HP-NAP (*H. pylori* neutrophil activating protein) und die durch die Adhärenz der Bakterien an der Mucosa ausgelöste Sekretion von Interleukin-8 (IL-8) aus den Epithelzellen tragen zu dieser Einwanderung von Neutrophilen bei. Die Granulozyten sezernieren ebenfalls IL-8, IL-1 β und TNF- α (Nielsen, 1992; Crabtree, 1994). Die Schädigung der Schleimhaut durch den oxidativen Burst und die freigesetzten Proteasen der Neutrophilen sowie die von der luminalen Seite einwirkenden bakteriellen Zytotoxine führen zu einer erhöhten Permeabilität der Epithelbarriere. Obwohl eine Invasion der Schleimhaut durch *H. pylori* nicht beobachtet wird, ermöglicht dies eine Phagozytose immunogener bakterieller Zellbestandteile, wie z.B. LPS, durch Makrophagen der Lamina propria (Tufano, 1994). Diese präsentieren Antigene an T-Helfer-Zellen, die sich unter dem Einfluss von aus Makrophagen freigesetztem IL-12 in TH1-Zellen differenzieren. Mehrere Arbeitsgruppen bestätigten bisher, dass das lymphozytäre Infiltrat bei der *H. pylori*-Gastritis überwiegend einem TH1-Phänotyp entspricht, weshalb sich auch hohe Konzentrationen an Interferon- (IFN-) γ in der Mucosa nachweisen lassen (Bamford, 1998; Sommer, 1998; Mattapallil, 2000). TH1-Zellen fördern sowohl die Reifung spezifischer Plasmazellen als auch über IFN- γ die Expression von MHC-II-Komplexen auf der Oberfläche der Magenepithelzellen. Letzteres scheint bei der Schädigung des Epithels über Mechanismen der Apoptose eine Rolle zu spielen (Fan, X., 1998; Jones, 1999).

1.3.2 Chronische Phase

Die chronische Phase der *H. pylori*-Infektion ist durch ein mononukleäres Infiltrat aus Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen gekennzeichnet (Wyatt, 1988). Es bilden sich lymphatische Aggregate und Lymphfollikel aus, die bei Kindern bisweilen im Rahmen endoskopischer Untersuchungen durch eine granuläre Schleimhautoberfläche sichtbar werden können. Antikörper vom IgG- und IgA-Typ können im Serum und Magensaft infizierter Personen nachgewiesen werden (Newell, 1987; Crabtree, 1991a). Sezerniertes IgA hat die Funktion, an im Lumen befindliche

Bakterien zu binden und so die Adhärenz an der Mukosa zu verhindern (Williams, 1972). Ob dieser Effekt jedoch auch für die *H. pylori*-Infektion zutrifft, ist in Frage zu stellen, da nachgewiesen werden konnte, dass das in den Magensaft sezernierte *H. pylori*-spezifische IgA zum größten Teil nicht mit der sekretorischen Komponente verbunden ist, was seine biochemische Stabilität im sauren Magensaft stark beeinträchtigt (Birkholz, 1998). Neben den protektiven Effekten der lymphozytären Immunreaktion der Mukosa, können molekulare Ähnlichkeiten zwischen bakteriellen und humanen Epitopen, wie sie beispielsweise zwischen Anteilen des *Helicobacter*-Lipopolysaccharids und dem menschlichen Lewis^x-Antigen (Aspinall, 1994) existieren, auch zu einer Verstärkung der Schleimhautschädigung führen, indem sich die humorale Immunantwort gegen körpereigene Strukturen richtet. Andererseits kann eine solche antigene Verwandtschaft für den Erreger auch Möglichkeiten einer Immunevasion eröffnen im Sinne eines Antigen-Mimikry. Ein experimenteller Beweis für die funktionelle Bedeutung solcher antigenen Homologien fehlt jedoch bisher.

1.4 Pathologie der *Helicobacter*-Krankheiten

Aus der hohen Prävalenz der *H. pylori*-Infektion trotz niedriger Neuinfektionsraten außerhalb des Kindes- und Jugendalters lässt sich bereits schließen, dass eine Infektion mit *H. pylori* in der Regel zu einer lebenslang persistierenden Besiedelung des Magens mit den Erregern führt. Auffallend ist jedoch, dass hieraus kein uniformes Krankheitsbild resultiert, sondern verschiedene pathologische Veränderungen auftreten können. Obwohl es bei jedem Infizierten in der Schleimhaut zu einer entzündlichen Reaktion unterschiedlicher Intensität kommt (Stolte, 1995), sind die meisten Betroffenen völlig beschwerdefrei. Einige Patienten entwickeln jedoch eine symptomatische Gastritis. Bei ca. 20-30% aller Patienten mit einer *Helicobacter*-assoziierten Gastritis entwickelt sich in der Folge eine gastroduodenale Ulcus-Krankheit, wobei insbesondere beim Ulcus duodeni eine hohe Assoziation zur *H. pylori*-Infektion besteht (Sipponen, 1990). Schließt man Patienten, die nicht-steroidale Antirheumatika eingenommen haben von der Analyse aus, so liegt jedoch auch beim Ulcus ventriculi in 93-95% der Fälle eine *H. pylori*-Infektion vor (Stolte, 1996). Nach anfänglich kontroverser Diskussion geht man ferner heute davon aus, dass die *H. pylori*-Infektion über die Entwicklung einer intestinalen Metaplasie eine

präkanzeröse Kondition darstellt (Forman, 1991; Craanen, 1992). Bakterielle Virulenzfaktoren scheinen das Risiko der malignen Transformation zu beeinflussen (Rudi, 1998).

1.5 Genetische Variabilität von *H. pylori*

Das antigene Spektrum verschiedener *H. pylori*-Stämme ist von einer hohen Variabilität gekennzeichnet (Costas, 1991). Die An- oder Abwesenheit von Genen oder Gengruppen wird als Makrovariabilität bezeichnet. Hierunter fällt beispielsweise die Expression der oben beschriebenen Pathogenitätsfaktoren. Hinzu kommt die Mikrovariabilität, welche auf einer hohen Zahl von Punktmutationen zwischen verschiedenen Stämmen beruht. Diese haben zum Teil keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz der kodierten Proteine und sind nur mithilfe molekulargenetischer Typisierungsmethoden nachweisbar, zum Teil können sie aber auch zu einem veränderten Phänotyp führen. (Majewski, 1988; Akopyants, 1992)

Die hohe genetische Mikrovariabilität kommt auch darin zum Ausdruck, dass bei Stichproben nur selten genetisch identische Stämme von verschiedenen Patienten isoliert werden. Wenn dies dennoch beobachtet wird, so lässt dieser Umstand auf eine vor kurzem erfolgte epidemische Ausbreitung des Erregers schließen, z.B. innerhalb einer Wohngemeinschaft. (Vincent, 1994)

Die hohe Mikro- und Makrovariabilität von *H. pylori* ist im Vergleich zu anderen pathogenen Bakterien ungewöhnlich, da sich bei vielen Infektionen in der Regel ein besonders virulenter Stamm dominant ausbreitet, sodass vorrangig dieser Stamm nachgewiesen werden kann (beispielsweise bei akuten bakteriellen Enteritiden durch pathogene *E. coli*-Stämme). Es ist noch nicht geklärt, wie die Mikrovariabilität von *H. pylori* entsteht. Hypothesen hierzu sind z.B. die Adaptation an einen Wirtsorganismus im Laufe der Infektion (Akopyants, 1995) oder der Austausch von Erbinformationen mit superinfizierenden Stämmen im Rahmen seiner natürlichen Kompetenz. (Nedenskov-Sorensen, 1990) Auch ist unbekannt, in welcher Weise die genetische Variabilität den Ablauf der Infektion beeinflusst.

1.6 Bisherige Untersuchungen zur Immunreaktion auf *H. pylori* in vitro

1.6.1 Methodik

Den immunologischen Abwehrmechanismen der Magenmukosa kommt bei der *H. pylori*-Infektion und der Pathogenese der Helicobacter-Folgeerkrankungen eine wichtige Rolle zu. Eine Reihe von Untersuchungen hat in der Vergangenheit dazu beigetragen, die Mechanismen der Induktion immunologischer Phänomene durch *H. pylori* näher zu charakterisieren.

Grundlage für die Untersuchung der zellulären Immunreaktion auf *H. pylori* in vitro sind Stimulationsverfahren, bei denen Komponenten der zellulären Immunabwehr mit dem Erreger oder bakteriellen Fragmenten inkubiert werden. Anschließend lässt sich die ausgelöste Aktivierung des Immunsystems qualitativ und quantitativ anhand verschiedener Parameter, wie z.B. der Zellproliferation oder der Zytokin-Synthese auf Protein- oder Genebene, charakterisieren. Immunkompetente Zellen werden in diesem Falle von Probanden isoliert, deren *H. pylori*-Infektionsstatus durch serologische oder mikrobiologische Testung festgestellt wurde. Durch verschiedene Verfahren zur Separation von Leukozyten können unterschiedliche Fraktionen des zellulären Immunsystems aus diversen Körperkompartimenten (z.B. Blut, Magenschleimhaut) untersucht werden. Zur Stimulation können in vitro verschiedene Präparationen des Bakteriums verwendet werden, z.B. lebende Organismen, abgetötete Ganzzell-Suspensionen, durch Zelldestruktion aufgeschlossene Bakterien-Präparationen oder aufgereinigte bakterielle Zellbestandteile wie Flagellen und Zellmembranen.

1.6.2 Charakterisierung der Immunantwort auf mononukleäre Zellen

Die Fähigkeit zur Aktivierung mononukleärer Zellen wurde mit den oben beschriebenen in-vitro-Verfahren näher charakterisiert. Sie äußert sich in der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, IFN- γ und TNF- α), der Expression von MHC-II-Komplexen und IL-2-Rezeptoren sowie einer gesteigerten Proliferationsrate, gemessen an der DNA-Synthese (Karttunen, 1990).

Für eine Stimulation von Lymphozyten durch Bakterien können verschiedene Mechanismen verantwortlich sein. In der Regel beinhalten immunologische

Reaktionen auf Mikroorganismen eine klonale Aktivierung antigen-spezifischer T-Helferzellen (Weir, 1983). Hierbei wird charakteristischerweise der T-Zelle ein Antigen-Fragment auf der Oberfläche eines Makrophagen in Verbindung mit einem komplementären MHC-II-Komplex präsentiert. Die Spezifität der Antigenerkennung wird dabei durch den für das Antigen spezifischen T-Zell-Rezeptor gewährleistet (Unanue, 1987).

Ein weiterer Aktivierungsmechanismus besteht in der mitogenen polyklonalen Stimulation von Lymphozyten. Zu diesen Mitogenen gehören Lektine, Lipopolysaccharide von gram-negativen Bakterien und die sog. Superantigene. Mitogene Lipopolysaccharide induzieren eine Aktivierung von Monozyten und eine polyklonale Proliferation von B-Lymphozyten unabhängig von akzessorischen Zellen (Miller, 1978; Persson, 1978). Superantigene unterscheiden sich von Lektinen dadurch, dass die polyklonale Aktivierung von T-Lymphozyten, die spezifische V-Regionen von Antigenrezeptoren tragen, nur in Gegenwart von MHC-II-tragenden akzessorischen Zellen erfolgt (Misfeldt, 1990).

Es konnte gezeigt werden, dass das Lipopolysaccharid von *H. pylori* gegenüber dem anderer gramnegativer Bakterien eine geringere biologische Aktivität hat (Muotiala, 1992; Birkholz, 1993a). Ferner erwies sich die Aktivierung von PBMZ durch *H. pylori* als MHC-II- und IL-2-abhängig, was durch Experimente mit blockierenden Antikörpern bewiesen werden konnte (Birkholz, 1993b). Auch die Proliferationskinetik mit ihrem Maximum am 7. Tag der Stimulation ähnelt der anderer antigenen Stimuli wie Tuberkulin (PPD) im Gegensatz zu der sehr viel rascheren Proliferationsantwort nach Lektin-Zusatz (PHA) oder Superantigen-Stimulation (Toxic shock syndrome toxin, TSST, von Staphylokokken), die vor dem 3. bzw. 5. Tag ihr Maximum erreicht. Die Stimulation von PBMZ ist auch nicht durch Polymyxin B, einen Inhibitor der biologischen Aktivität von Lipopolysaccharid, supprimierbar (Crabtree, 1991b), sodass auch die mitogene LPS-Wirkung als Ursache der Lymphozytenaktivierung ausgeschlossen werden kann.

Schließlich konnte durch Nachweis einer MHC-II-restringierten Stimulation spezifischer T-Zellen bewiesen werden, dass es sich bei der Stimulation von T-Zellen durch *H. pylori* um eine antigenen Stimulation handelt und nicht um eine Superantigen-, Lektin- oder LPS-Wirkung (Birkholz, 1993b).

1.6.3 Kreuzreagibilität

Eine der grundlegenden Beobachtungen bei der Untersuchung der Immunreaktion von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) auf *H. pylori* in vitro ist die Tatsache, dass unabhängig vom Infektionsstatus der Probanden eine zelluläre Immunantwort nachweisbar ist. Aktivierungszeichen finden sich nämlich auch dann, wenn PBMZ nicht *H. pylori*-infizierter Probanden mit Antigenen des Bakteriums inkubiert werden.

Eine solche Reaktion auf ein Neo-Antigen, mit dem das Immunsystem bisher noch keinen Kontakt hatte, ist unerwartet, wird jedoch auch bei einer Vielzahl anderer Spezies beobachtet (Räsänen, 1980; Piuvezam, 1993). Da die Stimulation wie oben beschrieben ausschließlich durch antigene Mechanismen vermittelt wird, lässt sich die Immunreaktion *H. pylori*-naiver Blutspender nur durch Kreuzreaktionen mit bakteriellen Antigenen erklären, die ubiquitär oder in kommensalen oder humanpathogenen Spezies besonders häufig vorhanden sind (Karttunen, 1990; Birkholz, 1993b). Mögliche kreuzreaktive *H. pylori*-Proteine sind beispielsweise die Urease, die Sequenzhomologien zu anderen bakteriellen Ureasen zeigt, Flagellin, das Homologien zum *Campylobacter*-Flagellin aufweist oder das bakterielle Hitzeschock-Protein, das Ähnlichkeiten zum *cpn60*-Hitzeschockprotein besitzt.

Die antigene Stimulation von PBMZ bei *H. pylori*-naiven Probanden beruht daher auf einem nicht exakt zu determinierenden kreuzreaktiven Antigenspektrum, was die Vergleichbarkeit mit der polyklonalen Stimulation bei infizierten Patienten erschwert.

1.6.4 Hinweise auf immunmodulierende und immunsuppressive Effekte bei der *H. pylori*-Infektion

Aus Beobachtungen in vivo ist bekannt, dass die *H. pylori*-Infektion in der Akutphase mit einer Infiltration der Magenmukosa durch Granulozyten (Sobala, 1991), später durch mononukleäre Zellen (Dixon, 1988) mit Ausbildung von Lymphfollikeln assoziiert ist (Stolte, 1989). Die Beobachtung einer lebenslang persistierenden Kolonisation des Magens mit *H. pylori* einerseits und einer voll ausgebildeten mukosalen Entzündungsreaktion andererseits führt zu der Frage, ob und in welcher Weise der Erreger die Immunantwort des Wirts beeinflussen kann, um bessere Überlebenschancen zu haben.

Vergleicht man die Immunantwort von PBMZ auf *H. pylori*-Antigene bei mit *H. pylori* infizierten und nicht infizierten Probanden, so kann man scheinbar paradoxerweise beobachten, dass die Proliferationsantwort von PBMZ infizierter Probanden deutlich schwächer ausfällt als bei nicht infizierten. (Karttunen, 1990; Birkholz, 1993b) Aufgrund obiger theoretischer Überlegungen wäre zu erwarten, dass die Recall-Antwort eines infizierten, d.h. immunisierten Organismus stärker ausgeprägt ist als die Stimulation durch ein eingeschränktes kreuzreaktives Antigen-Panel beim nicht Infizierten.

Diese Beobachtung liefert erste Hinweise darauf, dass vom Erreger oder vom Wirt ausgehende Mechanismen in Gang gesetzt worden sein könnten, welche die Immunreaktion des Organismus abschwächen und somit möglicherweise die Persistenz des Erregers begünstigen.

1.7 Problemstellung

Wenn die Proliferation von PBMZ bei mit *H. pylori* infizierten Personen schwächer ausfällt als bei nicht infizierten, so kann dies durch Adaptationsvorgänge im Immunsystem des Wirtes im Rahmen der Infektion bedingt sein.

Wir stellen die Hypothese auf, dass die Immunantwort auf *H. pylori* im Rahmen der Infektion herabreguliert wird, wodurch die Persistenz der Bakterien im Wirt begünstigt wird und die Infektion chronifiziert.

Eine solche veränderte Immunreaktion mit verminderter Aktivierbarkeit von PBMZ kann sich jedoch nur durch die Auseinandersetzung mit dem individuellen Antigen-Spektrum des infizierenden Stammes entwickelt haben. Es ist daher zu erwarten, dass die Herabregulation stammspezifisch erfolgt bzw. bei dem infizierenden Stamm am ausgeprägtesten ist im Vergleich zu anderen, genetisch unterschiedlichen Stämmen der gleichen Spezies.

Für den experimentellen Nachweis der stammspezifischen Immunmodulation ist es in Anbetracht der genetischen Variabilität der Stämme erforderlich, als bakteriellen Stimulus den Stamm zu untersuchen, der tatsächlich in einem Patienten gefunden wurde (autologer Stamm) und diese Reaktion quantitativ und qualitativ mit der auf heterologe Stämme der gleichen Spezies (*H. pylori*) zu vergleichen, die aus anderen Patienten isoliert wurden. Die Stimulation von PBMZ mit autologen, aus dem Magen

des Patienten gewonnenen Bakterien stellt aus diesem Grunde die zentrale, erstmals angewandte Arbeitstechnik dieser Untersuchung dar.

Hinzu kommt, dass die Antigene in den bisherigen Untersuchungen z.T. hitze- oder formalinbehandelt wurden. Da nicht bekannt ist, inwieweit diese Behandlung die antigenen Eigenschaften der Bakterienpräparation verändert, wurden hier ausschließlich kryokonservierte Suspensionen von lebend mechanisch zertrümmerten Bakterien verwendet. Auch die von den Probanden gewonnenen PBMZ wurden im Unterschied zur bisher meist verwandten Technik unmittelbar nach ihrer Isolierung ohne zwischenzeitliche Kryokonservierung in die Stimulationskulturen überführt, da sich gezeigt hatte, dass die Gefrierlagerung die Fähigkeit der Zellen zur Proliferation und Reaktion auf antigene Stimuli negativ beeinflusst.

Die Reaktion von PBMZ auf eine Stimulation durch *H. pylori*-Antigene wird in vitro an den Parametern der Proliferation und der Expression von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche gemessen. Ferner wird die Sekretion von Interleukin-10 als möglichem Vermittler immunsuppressiver Mechanismen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Wir untersuchten Patienten, die sich in der Endoskopie-Abteilung der Inneren Medizin II zur Abklärung einer gastrointestinalen Beschwerdesymptomatik einer Gastroskopie unterzogen. Die Patienten erteilten ihr Einverständnis zur Entnahme von 2 zusätzlichen Magenbiopsien und zur einmaligen Blutentnahme. Es handelte sich um 25 Personen (14 Männer und 11 Frauen) mit einem Durchschnittsalter von 59 Jahren (Minimum: 29 Jahre, Maximum: 85 Jahre). Die Endoskopie hatte bei 6 Patienten einen makroskopisch unauffälligen Befund ergeben, histologisch fand sich jedoch immer eine chronische, gering aktive Antrumgastritis. 6 Patienten wiesen eine ebenfalls histologisch bestätigte erosive Antrumgastritis und 3 Patienten eine Duodenitis auf. Bei 10 Patienten hatte die endoskopische Untersuchung eine gastroduodenale Ulcuskrankheit gezeigt (jeweils 5 Patienten mit Ulcera duodeni und ventriculi). Ein Magenkarzinom oder MALT-Lymphom fand sich bei keinem der Patienten. Ausschlusskriterien für weitere Untersuchungen waren eine laufende zytostatische oder immunsuppressive Therapie.

2.2 Material

2.2.1 Antikörper

2.2.1.1 Analyse der Oberflächenmarker

Für die Analyse der Oberflächenmarker von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) mittels Durchflusszytometrie wurden monoklonale, anti-humane, mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierte Antikörper von der Maus verwendet.

Spezifität	konjugiert mit	Hersteller
CD 4	PE oder FITC	DAKO
CD 8	PE oder FITC	DAKO
CD 25	PE	DAKO
HLA-DR	FITC	DAKO
CD 3	Cy-5	Immunotech
CD 71	FITC	Immunotech

Als negative Kontrolle erfolgte eine Färbung mit einem polyklonalen IgG1-Isotyp , der mit FITC, PE und Cy-5 konjugiert war (Fa. DAKO).

2.2.1.2 IL-10-Bestimmung

Die Bestimmung von IL-10 im Kulturüberstand erfolgte mittels ELISA. Hierbei wurde der Predicta Human IL-10-Kit der Fa. Genzyme Corp., Cambridge, MA, verwendet.

2.2.2 Antigene und mitogene Stimuli

In den Stimulationsversuchen kamen gereinigtes Tuberkulin (PPD) der Fa. Behring (Marburg), sowie das mitogene Lektin Phytohämagglutinin (PHA) der Fa. Sigma zum Einsatz.

2.2.3 Kulturmedien

2.2.3.1 Medien zur Bakterienkultur

2.2.3.1.1 Transportmedium

Zum Transport der Magenschleimhautbiopsien diente Soja-Bouillon mit Fildes-Extrakt (beides Fa. Oxoid).

2.2.3.1.2 Agar zur Anzucht von *H. pylori*

Die Primärkultur von *H. pylori* aus Biopsien erfolgte auf Selektivnährböden. Dazu wurde ein Blutagar (Columbia Base Agar 2 mit 10 % Pferdeblut, beides Fa. Oxoid) mit 4 mg/l Amphotericin B, 10 mg/l Vancomycin, 5 mg/l Trimethoprim und 2500 E/l Polymyxin B versetzt.

2.2.3.1.3 Flüssigmedium zur Bakterienkultur.

Die weitere Kultivierung erfolgte in einem wässrigen Flüssigmedium bestehend aus 37 g/l Brain-Heart-Infusion (BHI) Bouillon (Fa. Oxoid), 0,25% Hefeextrakt und 1% Hämin, welchem vor Kulturansatz noch 7% steriles Pferdeserum (Fa. Gibco) zugefügt wurde

2.2.3.2 Medien für die Zellkultur

2.2.3.2.1 Waschmedium und Verdünnungsmedium

Zur Herstellung des Waschmediums wurden 50 ml 10fach konzentriertes RPMI 1640-Medium (Fa. Gibco), 5 ml 1M HEPES (pH 7,3), 13,5 ml 7,5 %ige NaHCO₃-Lösung, 10 ml 200mM L-Glutamin-Lösung, 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (5000 IE/ml Penicillin und 5 mg/ml Streptomycin), 2,5 ml 1 N NaOH und 10 ml FCS (Fa. Gibco) mit sterilem Aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt. Das Verdünnungsmedium war ebenso zusammengesetzt, enthielt jedoch kein FCS.

2.2.3.2.2 Zellkulturmedium

Zur Herstellung des Zellkulturmediums wurden je 100 ml RPMI-1640-Medium 2 ml einer 200 mM L-Glutamin-Lösung und 1 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung sowie 10% humanes AB-Serum (Fa. Whittaker) zugesetzt. Das Serum wurde zuvor bei 56°C für 30 Minuten deaktiviert.

2.2.4 Bakterien

2.2.4.1 Heterologe *H. pylori*-Stämme

Als heterologe Antigene wurden *Helicobacter pylori*-Stämme der National Collection of Type Cultures (NCTC), London, (NCTC 11637 und NCTC 11639) sowie ein von Geis (1989) beschriebenes, in Dauerkultur gehaltenes klinisches Isolat eines Patienten (Stamm 8981) eingesetzt.

2.2.4.2 Autologe *H. pylori*-Stämme

Von allen 25 Patienten konnten (wie unter 2.3.1 beschrieben) *H. pylori*-Stämme angezüchtet werden. Nach Bebrütung der Primärkulturen in Homburg und positivem Wachstumsnachweis wurden die Agarplatten an das Mikrobiologische Institut der Ruhr-Universität Bochum übersandt, wo die Überführung in Flüssigmedien und weitere Vermehrung der Bakterien sowie die Herstellung der Sonikate erfolgte. Diese wurden kryokonserviert zurückgesandt und zur autologen Stimulation eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.3.3).

2.3 Methoden

2.3.1 Anzucht der autologen *H. pylori*-Stämme

2.3.1.1 Anlegen der Primärkultur

Endoskopisch entnommene Biopsien wurden in sterilem Transportmedium ins Labor gebracht und dort auf Selektivagarplatten ausgestrichen. Diese wurden bei 37° C in feuchter, sauerstoffreduzierter und CO₂-angereicherter (microaerophiler) Atmosphäre (durch Zusatz von Anaerocult C, Fa. Merck, im Anaerobiertopf) für 3 - 5 Tage bebrütet, bis sich *H. pylori*-Kolonien als ca. 1 mm große, glasig bis matt glänzende Herde darstellten. Die Identifikation erfolgte durch die typische Koloniemorphologie sowie Gram-Färbung und Testung auf Vorhandensein von Urease und Oxidase. Die Kulturen wurden dann zur weiteren Anreicherung in das Flüssigkulturmedium überführt.

2.3.1.2 Anzucht der Bakterien

Die Anzucht der Bakterienkulturen in Flüssignährmedium erfolgte wie bereits beschrieben (Geis, 1989). *Helicobacter*-Kulturen wurden von Agarplatten abgestrichen und in PBS suspendiert. Hieraus wurde zunächst durch Zugabe zu 10-15 ml BHI-Medium eine Vorkultur hergestellt und 24-48 h in microaerophiler Atmosphäre im Schüttelinkubator bei 100-120 Upm und 37°C bebrütet. Aus der Vorkultur wurden 1-2 ml in 200 ml Medium überimpft und erneut für 36-72 h unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Danach konnten die Bakterien durch Zentrifugation (bei 12500 x g und 10°C für 20 min) und waschen in PBS gewonnen werden.

2.3.1.3 Herstellung der Sonikate

Bakterien aus insgesamt 400 ml Flüssigkultur wurden in 7,5 ml PBS resuspendiert und im Eisbad gekühlt. Nach Zugabe von Glasperlen wurden die Bakterien mit dem Branson Sonifier (Modell W 185) in 4 - 6 Intervallen à 20 s lysiert. Nach dem Entfernen der Glasperlen wurden die Sonikate aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.3.1.4 Proteinbestimmung

Die Gesamtproteinkonzentration der Sonikate wurde mit einem Assay der Fa. BioRAD bestimmt. Die entstehende Farbreaktion wurde mittels Absorptions-Spektrometrie quantifiziert. Als Standard diente bovines Serumalbumin.

2.3.2 Isolation von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut

Nach Anzucht der Bakterien, Herstellung der Bakterien-Sonikate und Rücksendung an unser Labor wurden die Patienten zu einer Blutentnahme einbestellt. Diese erfolgte im Mittel 11 Wochen (Minimum 2, Maximum 20 Wochen) nach der initialen Gastroskopie. Die Gewinnung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) erfolgte aus heparinisiertem Vollblut durch Dichtegradienten-Zentrifugation. Hierzu wurden je 10 ml Vollblut in 50ml-Kunststoff-Tubes mit konischem Boden (Fa. Greiner) überführt und mit Verdünnungsmedium auf 35 ml verdünnt. Danach wurden 10 ml einer endotoxinfreien Gradientenzentrifugationslösung (Ficoll Pacque, Fa. Pharmacia Biotech) unterschichtet. Nach der darauf folgenden Zentrifugation bei $1080 \times g$ für 20 min konnte der Interphase-Ring mit den darin enthaltenen mononukleären Zellen mit einer Pipette abgenommen werden. Es folgten drei Waschzyklen. Die Zahl vitaler Zellen wurde durch Exklusion von Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Abschließend wurden die Zellen zur Stimulation in Kulturmedium aufgenommen. Für sämtliche Stimulationsreihen und die nachfolgenden Messungen wurden die Zellen ohne zwischenzeitliche Kryokonservierung eingesetzt, um die Reaktionsfähigkeit der Leukozyten nicht zu beeinflussen.

2.3.3 Stimulation von PBMZ mit heterologen und autologen H. pylori-Sonikaten

Die Stimulation der isolierten PBMZ mit Antigenen der verschiedenen H. pylori-Stämme erfolgte in 96-well-Mikrotiter-Platten (U-Boden). Pro Kavität wurden 1×10^5 Zellen in 200 µl Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Dabei kamen als Antigene der autologe Stamm des Patienten und die verschiedenen heterologen Stämme 8981, NCTC 11637 und NCTC 11639 zum Einsatz. Die Sonikate wurden jeweils in einer Gesamtproteinkonzentration von 5 µg/ml zugesetzt. Als Kontrollen dienten die antigene Stimulation mit 10 µg/ml gereinigtem Tuberkulin

(PPD) sowie die mitogene Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) in einer Konzentration von 2 µg/ml. Die negative Kontrolle bestand in einer Kultur ohne Antigen- oder Mitogenzusatz. Die Dauer der Inkubation in Anwesenheit der Antigene bzw. Mitogene war abhängig von der beabsichtigten Messung und wird dort angegeben.

2.4 Messverfahren

2.4.1 Bestimmung von IL-10 im Kulturüberstand

Zur Bestimmung der Produktion von IL-10 durch *Helicobacter*-stimulierte PBMZ (autolog und heterolog mit Stamm 8981, jeweils 5µg/ml) wird der Zellkulturüberstand nach 24 Stunden abgenommen, zentrifugiert und bis zur Messung bei -70°C gelagert.

Die Bestimmung des freigesetzten IL-10 erfolgte nach dem Prinzip des Sandwich-ELISA auf Mikrotiterplatten mit dem Predicta Human IL-10 Kit (Fa. Genzym Corp., Cambridge, Massachusetts) laut den Anweisungen des Herstellers. Die Farbreaktion wurde mit dem ELISA-Reader quantifiziert. Nach Erstellung einer Eichkurve mittels Verdünnungsreihe eines Probenstandards konnte so die IL-10-Konzentration im Kulturüberstand berechnet werden.

2.4.2 Messung der Proliferation (DNA-Synthese) von stimulierten PBMZ

Die Bestimmung der Proliferation von mit *Helicobacter pylori* stimulierten PBMZ erfolgte über die Messung der DNA-Synthese anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin in die Zellen.

Hierzu erfolgte die Stimulation mit der Mediumkultur als Leerwert, mit PPD, PHA und den *H. pylori*-Sonikaten in einer Konzentration 5 µg/ml. Alle Ansätze mit den verschiedenen Antigenen und Dosierungen wurden jeweils als Dreifach-Bestimmung angesetzt.

Entsprechend der Voruntersuchungen zur Kinetik der Proliferation (Birkholz, 1993b) erfolgte die Kultur für 7 Tage, wobei 18 Stunden vor Ende der Stimulation ³H-

markiertes Thymidin (Fa. Amersham; 0,5 µCi pro Kavität mit 10⁵ Zellen) zugesetzt wurden.

Die Zellen wurden sodann mit einem Zellerntegerät (PHD cell harvester, Fa. Cambridge Technol. Inc.) von der Mikrotiterplatte abgesaugt und auf Glasfaserfilterplättchen überführt. Nach Zugabe einer Szintillationslösung (Instagel Plus, Fa. Packard) konnte die inkorporierte Radioaktivität mit einem Szintillationszähler (Betasint BF 5000) als Zerfälle pro Minute (CPM) gemessen werden.

Nach Abzug der Hintergrundstrahlung von allen Messwerten wurde zum Vergleich der Proliferationsrate stimulierter PBMZ mit in Medium kultivierten PBMZ der Stimulationsindex (SI) berechnet:

$$\text{SI} = \frac{\text{CPM(Stimulation)} - \text{CPM (Medium)}}{\text{CPM Medium)}$$

2.4.3 Flowzytometrie

2.4.3.1 Gewinnung der Zellen

Die Bestimmung der Expression von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche stimulierter Lymphozyten erfolgte nach 6 Tagen Kultivierung. Hierfür wurden der autologe Stamm und der heterologe Stamm 8981 (jeweils in einer Konzentration von 5µg/ml) eingesetzt. Die Kultur in Medium alleine stellte die Kontrolle dar. Die Zellen wurden abpipettiert, zentrifugiert und in FACS-Puffer (PBS mit 2%FCS) mit ca. 1-2 x 10⁵ Zellen/ml resuspendiert

2.4.3.2 Markierung der Oberflächenantigene (Dreifach-Fluoreszenz)

Um die zu untersuchenden Zellpopulationen getrennt vermessen zu können, wurde eine Dreifach-Färbung mit Antikörpern jeweils unterschiedlicher Spezifität und Fluoreszenz-Konjugate durchgeführt. Die Antikörper-Lösungen wurden in der vom

Hersteller angegebenen Menge zur Zellsuspension gegeben. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln für 20 Minuten. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in FACS-Puffer resuspendiert.

Jede Zellfraktion wurde nach folgendem Schema simultan mit 3 Antikörpern unterschiedlicher Spezifität inkubiert:

1. Färbung	CD 3 +					
2. Färbung	CD 4 +			CD 8 +		
3. Färbung	CD25+	HLA- DR+	CD71+	CD25+	HLA- DR+	CD71+

2.4.3.3 Durchflusszytometrie

Die Messung der Fluoreszenz-markierten Zellen erfolgte mit einem FACSVantage-Gerät der Fa. Becton Dickinson. Für jede Färbung und Stimulationsgruppe (Medium, autolog und heterolog) wurden mindestens 2×10^4 Zellen analysiert. Die Daten wurden mit der Software "Attractors" ausgewertet.

Zunächst erfolgte die Identifikation der Lymphozyten-Fraktion anhand ihrer typischen Lokalisation im sog. Vorwärts-Seitwärts-Scatter. Hierbei wurden die Größe der gemessenen Zelle sowie die Granularität des Zellinhaltes durch Abtastung mit einem Laserstrahl erfasst und zweidimensional dargestellt. Durch Anlegen eines Gates (Selektionsvorgabe) um die an typischer Stelle des Scatters lokalisierte Lymphozyten-Wolke konnten Zelltrümmer ebenso wie Makrophagen und evtl. vorhandene Granulozyten von der Analyse ausgeschlossen werden.

Anschließend wurden die Zellen durch die Antikörper-Färbungen weiter charakterisiert. Dabei wurde eine Zelle als für einen Antikörper-Bindungspartner positiv gewertet, wenn die Fluoreszenz-Intensität nach Färbung mit dem jeweiligen Antikörper höher war als die Fluoreszenz mit dem Isotyp, einem unspezifischen IgG-Gemisch, das ebenfalls alle 3 Farbkomponenten enthielt. T-Lymphozyten wurden zunächst durch Auswahl der CD3+ Zellen selektiert. Nur diese Zellen wurden zur

weiteren Untersuchung der Subgruppen verwendet. Zunächst erfolgte eine Trennung nach CD4+ und CD8+ T-Zellen. Innerhalb dieser Populationen wurde der Anteil der die verschiedenen Aktivierungsmarker (CD25, HLA-DR, CD 71) exprimierenden Zellen bestimmt.

2.5 Statistische Auswertung

Die hier durchgeführten statistischen Berechnung dienten dem Vergleich der gemessenen Daten unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen. Hierbei sollten insbesondere Unterschiede zwischen autologer und heterologer Stimulation sowie jeweils zwischen beiden Stimulationsarten und der Medium-Kultur als negativer Kontrolle untersucht werden.

Die gemessenen Werte für Proliferation, Expression von Aktivierungsmarkern und IL-10-Sekretion sind in der Population der untersuchten Patienten nicht normalverteilt. Daher werden die Messergebnisse in der Regel als Median mit Maximum und Minimum oder Range angegeben. Da unterschiedliche Stimulationsbedingungen intraindividuell über die Gesamtzahl der untersuchten Patienten gegenüberzustellen waren, erfolgte der statistische Vergleich mithilfe eines nicht-parametrischen Testes für zwei verbundene Stichproben (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Das Signifikanzniveau, mit der die Nullhypothese widerlegt werden konnte, wird als p-Wert zu jedem Vergleich angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Proliferation von PBMZ nach Stimulation durch H. pylori-Sonikat

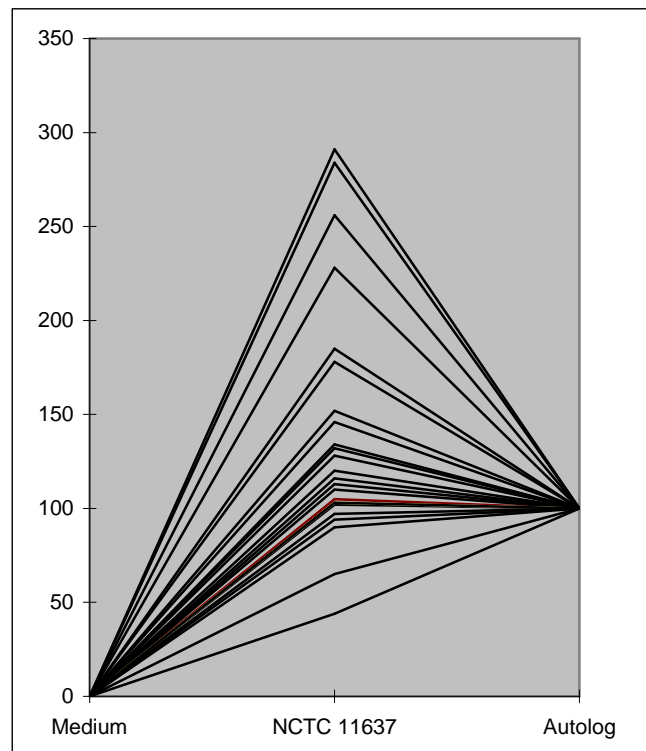
Die Inkubation mit H. pylori-Antigenen führte zum Anstieg der Proliferationsrate von PBMZ im Vergleich zur Kultur im Medium alleine (positiver Stimulationsindex, SI). Eine Unterdrückung der Zellproliferation (negativer Stimulationsindex) durch Zugabe von H. pylori-Sonikaten konnte dagegen in keinem Fall festgestellt werden.

PHA als mitogener Stimulus führte bei den meisten Patienten zu einer hohen Zellteilungsrate von PBMZ (medianer SI 11,7). Die zur Kontrolle bestimmte antigene Stimulation durch gereinigtes Tuberkulin war interindividuell unterschiedlich. Sowohl minimale als auch sehr starke Inkorporation des Tracers wurde beobachtet (medianer SI 7,5; Range 0,4 – 81,8). Im Vergleich dazu bewirkten H. pylori-Sonikat einen im allgemeinen geringeren Proliferationsanreiz. Wurden PBMZ eines infizierten Probanden mit dem seines eigenen, aus dem Magen isolierten H. pylori-Stammes (autologer Stamm) inkubiert, so betrug der mediane SI 3,8 (0,0-19,3). Hingegen war bei heterologer Stimulation mit Stämmen eines anderen Patienten oder Laborstämmen die Proliferationsrate höher: z.B. wurde für den Stamm 8981 ein medianer SI von 5,9 (0,3 – 67,7) gemessen.

Stamm	N	Stimulationsindex (SI)		P (im Vgl. zu autolog)
		Median	Range	
Autolog	25	3,8	0,0 – 19,3	
8981	25	5,9	0,2 – 67,7	0,028
NCTC 11637	25	4,6	0,2 – 54,8	0,003
NCTC 11639	23	4,9	0,2 – 54,8	0,059 (n.s.)

Tabelle 1. Stimulationsindizes von PBMZ nach Inkubation mit H. pylori-Sonikat über 7 Tage

Insbesondere im intraindividuellen Vergleich fällt auf, dass bei der Mehrzahl der Patienten nach heterologer Stimulation eine stärkere Proliferation beobachtet wird als umgekehrt. Bei 21 von 25 Patienten werden z.B. die PBMZ durch den heterologen Stamm 11637 stärker stimuliert als durch den autologen, während nur 4 von 25 Patienten auf den eigenen Stamm stärker reagierten.



Graphik 1 . Proliferation von PBMZ in Medium alleine oder nach Zusatz von autologen oder heterologen (NCTC 11637) *H. pylori*-Sonikaten. Darstellung in Relation zum autologen Stamm, dessen Stimulationsindex mit 100% gleichgesetzt wurde. Die Linien repräsentieren 25 individuelle Patienten.

Statistisch konnte für die Stämme 8981 und NCTC 11637 ein signifikanter Unterschied zum autologen Stamm nachgewiesen werden ($p=0,028$ bzw. $0,003$). Beim Stamm NCTC 11639 war ebenfalls ein im Mittel höherer Stimulationsindex nachweisbar, der Unterschied erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau ($p=0,059$).

3.2 Expression von Aktivierungsmarkern

Als Maß für den Aktivierungszustand von T-Zellen wurde die Expression von MHC-II-Molekülen (HLA-DR), Interleukin-2-Rezeptoren (CD25) und Transferrin-Rezeptoren (CD71) nach autologer und heterologer (Stamm 8981) Stimulation sowie in unstimulierten Kulturen (Medium) bestimmt.

Nach Inkubation mit Sonikaten verschiedener *H. pylori*-Stämme war zu beobachten, dass der Anteil der einen Aktivierungsmarker tragenden T-Zellen deutlich anstieg. So steigerte sich der Anteil HLA-DR-positiver CD4-Zellen (CD4+/HLA-DR+) nach

Stimulation mit dem Stamm 8981 von 6,6% auf 11,9% aller CD4-Zellen in der untersuchten Probe.

Auch bei Verwendung der homologen H. pylori-Sonikate war im Vergleich zur Kultur in Medium alleine ein Anstieg der Expression von HLA-DR und CD71 auf CD4-Zellen zu beobachten. Für CD25 ergab sich jedoch bei homologer Stimulation kein signifikanter Unterschied. Auch die Population der CD8+ T-Zellen (T-Suppressor-Zellen) zeigte nach Kultivierung in Anwesenheit von H. pylori-Sonikaten eine signifikant vermehrte Expression von HLA-DR, CD25 und CD71. Auffallend war hier der relativ hohe Anteil HLA-DR+ CD8-Zellen selbst ohne Antigen-Stimulation von 27,3%. Dieser steigerte sich nach Zugabe von H. pylori-Sonikat auf 34,0% bei Stamm 8981 und auf 33,7% nach autologer Stimulation.

T-Zell- Population	CD 4 +			CD 8 +		
Aktivierungs- marker	CD 25+	HLA-DR+	CD 71+	CD 25+	HLA-DR+	CD 71+
Medium	10,25 (5,9 - 18,6)	6,6 (2,1 - 24,7)	1,1 (0,3 - 18,5)	2,6 (1,0 - 14,5)	27,3 (5,7 - 59,7)	2,3 (0,3 - 21,1)
Heterologe Stimulation (8981)	11,62 (8,7 - 19,3)	11,9 (5,5 - 24,6)	4,2 (1,0 - 15,0)	3,9 (1,2 - 13,9)	34,0 (13,7 - 61,0)	5,3 (1,9 - 18,5)
Autologe Stimulation	11,32 (7,7 - 18,8)	11,2 (5,3 - 23,0)	3,9 (1,1 - 15,1)	4,0 (1,4 - 13,8)	33,7 (12,5 - 49,3)	5,6 (1,4 - 18,7)
n=	20	21	21	19	19	19
Vergleich autolog-heterolog	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 2. Expression von Aktivierungsmarkern auf PBMZ nach Medium-Kultur und autologer bzw. heterologer Stimulation durch H. pylori-Sonikat. Anteil marker-positiver Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl CD4+ bzw. CD8+ Zellen in %. Angegeben sind Median (Minimum – Maximum).

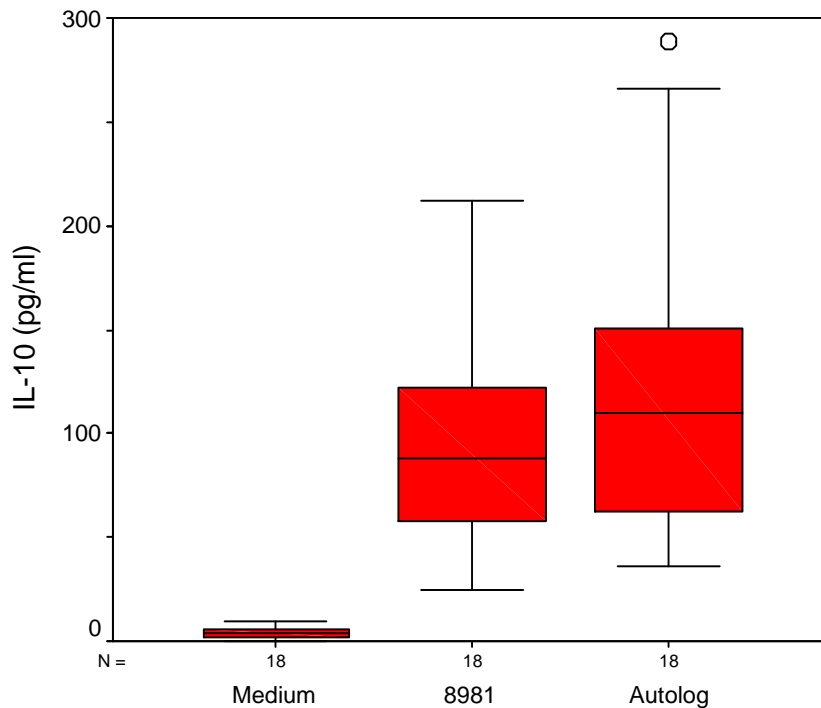
Signifikante Unterschiede zwischen autologer und heterologer Stimulation ließen sich jedoch in fast keiner der untersuchten T-Zell-Subpopulationen nachweisen. Zwar errechnete sich bei der CD25-Expression von CD4+ Zellen hier eine signifikante Differenz, da 18 von 20 Patienten eine prozentual höhere CD25-Positivität nach heterologer Stimulation aufwiesen. Allerdings war dieser Ansatz auch der einzige, in dem kein signifikanter Markeranstieg im Vergleich zwischen autologer Stimulation

und Medium-Kultur gefunden werden konnte. Auch zeigte die mediane CD25-Expression auf CD4+ T-Zellen nur geringe Veränderungen unter Stimulation (10,5% bei Medium-Kultur, 11,6% und 11,3% bei heterologer bzw. autologer Stimulation), sodass diese rechnerische Signifikanz nicht relevant erscheint.

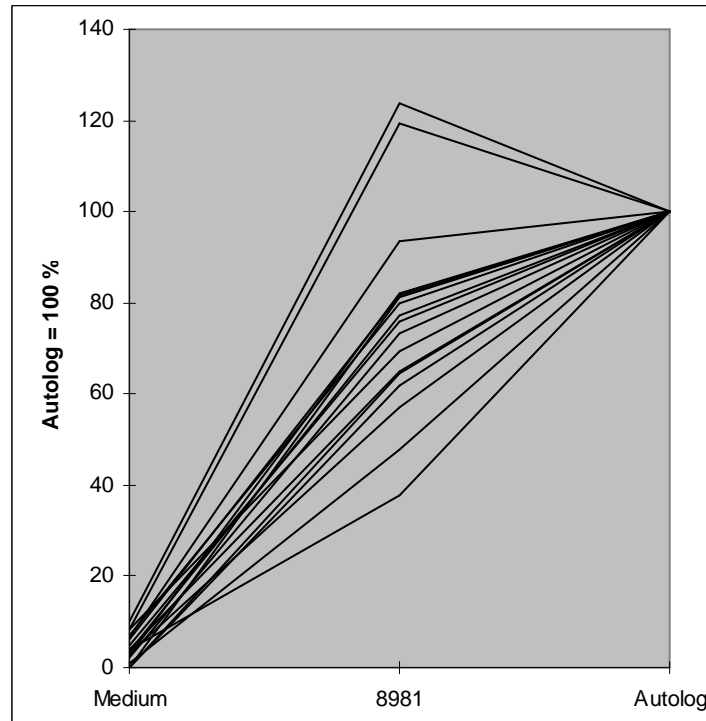
3.3 IL-10-Produktion

Um zu untersuchen, ob die verminderte Proliferationsantwort von PBMZ nach autologer Stimulation durch vermehrte Sekretion inhibitorischer Zytokine vermittelt sein könnte, erfolgte die Bestimmung von Interleukin 10 (IL-10) im Überstand der Zellkulturen mittels ELISA.

Ohne Antigenzusatz waren nur minimale Mengen IL-10 im Kulturmedium nachweisbar (0-9 pg/ml). Zugabe von *H. pylori*-Sonikaten führte zu einer deutlichen Steigerung der IL-10-Synthese durch die PBMZ. Der Stamm 8981 induzierte IL-10-Konzentrationen zwischen 25 und 212 pg/ml (Median 88 pg/ml) bei 1×10^5 Zellen in 200 µl pro Kavität. Nach autologer Stimulation konnten im Überstand 36 – 289 (Median 110) pg/ml IL-10 gemessen werden. Im intraindividuellen Vergleich waren bei 15 von 18 Patienten höhere Konzentrationen des Zytokins nach autologer Stimulation nachweisbar, was auf einen signifikanten Unterschied der IL-10-Produktion schließen lässt ($p=0,01$).



Grafik 2: IL-10-Konzentration (pg/ml) im Kulturüberstand von heterolog (Stamm 8981), autolog oder in Medium kultivierten PBMZ nach 24 Stunden. Der Boxplot gibt Median, 25- und 75-Prozent-Perzentile sowie Minimum, Maximum und Ausreißer-Werte an.



Grafik 3: Intraindividuellem Vergleich der IL-10-Konzentrationen im Kulturüberstand. Jede Linie repräsentiert einen Patienten. Darstellung der Messwerte in Relation zur autologen Stimulation, die mit 100% angesetzt wird. Deutlich zu erkennen ist, dass bei der Mehrzahl der Patienten die IL-10-Ausschüttung nach autologer Stimulation höher ist als nach heterologer Stimulation

4. Diskussion

In den hier vorgelegten Untersuchungen wurde erstmals die Stimulation von PBMZ *H. pylori*-infizierter Patienten durch autologe (vom Patienten selbst stammende) und heterologe (von anderen infizierten Patienten stammende) *H. pylori*-Antigene verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Proliferationsantwort bei autologer Stimulation signifikant geringer ausfiel als bei Inkubation mit heterologen Antigenen der gleichen Spezies. Der Versuch macht deutlich, dass die autologe Stimulation mit höherer Übereinstimmung der in vivo vorhandenen Antigene mit dem in vitro präsentierten Antigen-Gemisch eine schwächere Aktivierung der PBMZ bewirkt. Dieses deutet auf eine für den infizierenden Stamm hochselektive Herab-Regulation der Immunantwort gegenüber den kolonisierenden Bakterien hin.

Im Rahmen der Versuche, die lebenslange Persistenz der *H. pylori*-Infektion zu erklären, wird bereits seit längerem diskutiert, ob immunmodulierende Effekte eine Rolle bei ihrer Chronifizierung spielen, da der Erreger offensichtlich sowohl in vivo als auch in vitro in der Lage ist, Effektorzellen des humanen Immunsystems zu aktivieren, es jedoch trotzdem nicht zur Elimination des Keims kommt. Für eine Reihe von Bakterien wurden zellgebundene oder lösliche Faktoren identifiziert, die immunsuppressive Effekte vermitteln und damit zum Überleben des Erregers beitragen, wie z.B. bei *Pseudomonas aeruginosa* (Holt, 1986; Staugas, 1992), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Taichmann, 1980; Shenker, 1982) und insbesondere den häufig chronisch verlaufenden Infektionen durch Mykobakterien (Kaplan, 1987; Brownback, 1988; Fournie, 1989).

Auch für *H. pylori* wurde ein bakterielles Protein beschrieben, das die antigen- oder mitogen-induzierte Proliferation von PBMZ deutlich supprimieren kann (Knipp, 1993). Dieser Effekt tritt bei Konzentrationen an *H. pylori*-Antigenen auf, die um den Faktor 6 über denen liegen, die zur Induktion der maximalen Proliferation von PBMZ erforderlich sind. Die Inaktivierung des immunsuppressiven Faktors durch Hitzebehandlung führt jedoch zu einer deutlich gesteigerten Proliferation von PBMZ in vitro, was darauf hinweist, dass der Faktor auch bei der maximal stimulatorisch wirksamen Antigen-Konzentration einen inhibierenden Einfluss hat. Die suppressive Wirkung scheint nicht über zytotoxische Effekte vermittelt zu werden und ist nicht mit dem Vorhandensein des Zytotoxins VacA assoziiert. Die inhibitorische Wirkung betraf jedoch gleichermaßen PBMZ *H. pylori*-infizierter wie nicht-infizierter Probanden,

sodass der Effekt unspezifisch erscheint und nicht für die hier beobachteten Unterschiede zwischen heterologer und autologer Stimulation verantwortlich sein kann.

Die Beobachtung einer gesteigerten Proliferation von PBMZ nach heterologer Stimulation mit *H. pylori*-Antigenen hat Ähnlichkeit mit der höheren Wachstumsrate dieser Zellen bei Stimulation durch heterologe Darmflora. Es konnte bereits nachgewiesen werden (Duchmann, 1995), dass Sonikate, die aus Darmbakterien eines Individuums gewonnen werden, PBMZ derselben Person nicht stimulieren, während dies bei anderen Personen deutlich der Fall ist. Dies wird als Toleranz gegenüber der autologen Flora interpretiert. Die Entwicklung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) wie M. Crohn und Colitis ulcerosa stellt möglicherweise eine unkontrollierte Immunreaktion gegen bakterielle Antigene der Darmflora dar. Als Folge der inflammatorischen Reaktion wird ähnlich wie in der Magenmukosa bei der *H. pylori*-Infektion die Integrität der mucosalen Epithelbarriere geschädigt. Der dadurch ermöglichte stärkere Einstrom luminaler Antigene in die Lamina propria könnte zur Chronifizierung der mukosalen Entzündung beitragen.

Bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen scheinen CD4+ T-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen (Zeitzi, 1997; Stallmach, 1998). Bei Patienten mit CED wurde sowohl in der Mukosa als auch im peripheren Blut eine klonale Expansion von CD4-Zellen beobachtet (Gulwani, 1996; Probert, 1996). CD4-Zellen scheinen auch in einigen Tiermodellen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine zentrale Rolle zu spielen (Claesson, 1996; Leach, 1996). Es wurde ferner bereits beschrieben, dass bei CED die mononukleären Zellen der Lamina propria in den entzündlich veränderten Regionen der Darmschleimhaut, nicht jedoch in den nicht entzündeten Bereichen und auch nicht im peripheren Blut ihre Toleranz gegenüber der autologen Flora verlieren (Duchmann, 1995).

Es steht daher zur Diskussion, ob das Ausmaß der entzündlichen Veränderungen der Magenmukosa mit der Proliferationsantwort mononukleärer Zellen auf heterologe oder autologe *H. pylori*-Antigene korreliert. In dem hier untersuchten Kollektiv fand sich bei 10 von 25 Patienten eine gastroduodenale Ulcuserkrankung, während bei den übrigen 15 Patienten eine Gastritis oder Duodenitis vorlag. Die Stimulationsindizes von PBMZ beider Gruppen unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander. Um Zusammenhänge zwischen der Proliferationsantwort von

PBMZ und dem Grad der entzündlichen Veränderungen weiter zu untersuchen, sind größere Patientenzahlen notwendig.

Die Expression von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche von T-Zellen war nach Stimulation mit *H. pylori*-Antigenen deutlich erhöht. Eine gesteigerte Expression von HLA-DR und IL-2-Rezeptoren auf T-Zellen wurde bereits unter Verwendung eines formalin-fixierten Antigengemisches aus dem Stamm NCTC 11637 und 5 Patientenstämmen beschrieben (Karttunen, 1991). Er fand jedoch keine Unterschiede zwischen *H. pylori*-positiven und *H. pylori*-negativen Blutspendern. In den hier durchgeführten Untersuchungen an *H. pylori*-infizierten Patienten fanden sich keine Unterschiede zwischen autologer und heterologer Stimulation. Möglicherweise ist dies unter anderem darauf zurückzuführen, dass die Anzahl *Helicobacter*-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut vergleichsweise gering ist, sodass stamm-spezifische Veränderungen bei der Expression von Aktivierungsmarkern nicht diskriminiert werden können. Daher könnte die Untersuchung des entzündlichen Infiltrates in der Lamina propria der Magenmukosa auf seine Stimulierbarkeit durch *H. pylori*-Antigene hierzu eine genauere Aussage ermöglichen.

Es stellt sich außerdem die Frage, ob Mechanismen, welche die zelluläre Immunantwort herabregulieren, zur Chronifizierung der Infektion beitragen. Bei einer Vielzahl infektiöser Erkrankungen nimmt die Fähigkeit von Mikroorganismen, sich vor der immunologischen Abwehr des Wirts zu schützen, eine wichtige Rolle in der Pathogenese ein. So sind bei zahlreichen Erregern immunsuppressive Eigenschaften nachgewiesen worden, die auch gleichzeitig mit immunstimulierenden Faktoren auftreten können. Manchmal scheint ein und dieselbe Substanz in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen auch beide Effekte hervorrufen zu können. (Lyons, 1978; Räsänen, 1981; Kaplan, 1987; Piuvezam, 1993; Miethke, 1995) Das oben bereits erwähnte proliferations-inhibierende Protein von *Helicobacter pylori* ist nicht zytotoxisch wirksam, es inhibiert jedoch die akzessorische Funktion von Monozyten und hat eine antiproliferative Wirkung auf eukaryontische Zellen wie Lymphozyten und Magenepithelzellen. (Knipp, 1993; Knipp, 1994) Es ist vorstellbar, dass dieses Protein auch in vivo die volle Ausbildung der Immunantwort und die Regeneration des Magenepithels behindert.

Bisher wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die im Verlauf bakterieller Infektionen zu einer Begrenzung der Immunreaktion führen könnten.

Wenn bei einer MHC-II-abhängigen Antigenpräsentation die Ligandenbindung des T-Zell-Oberflächenantigens CD 28 mit dem entsprechenden B7-Rezeptor auf der Antigen-präsentierenden Zelle unterbleibt, wird eine T-Zell-Anergie induziert. (Gimmi, 1993; Ding, 1994) Bei einem sekundären Antigenstimulus sind die T-Zellen dann nicht mehr in der Lage zu proliferieren und sezernieren weniger Zytokine, sodass die inflammatorische Kaskade unterbrochen wird.

Blaser postulierte als mögliche Erklärung für eine nicht-protective Immunantwort ein vermehrtes Auftreten von CD8+ Suppressor-T-Zellen bei der Helicobacter-Gastritis, da er eine erhöhte Anzahl von CD8+ Zellen nach Stimulation von peripheren mononukleären Zellen mit Helicobacter-Antigenen fand. (Blaser, 1992) Auch in der Population der Mucosa-assoziierten mononukleären Zellen (MAMC) waren die CD8+ Zellen vermehrt und wiesen zudem häufiger den Aktivierungsmarker HLA-DR auf der Zelloberfläche auf. (Fan, X. J., 1994; Ihan, 1995) Hierzu liegen jedoch auch widersprüchliche experimentelle Daten vor. So finden einige andere Autoren eher ein Überwiegen der CD4+ Zellen in der Lamina propria Helicobacter-infizierter Mägen. (Kirchner, 1990; Colton, 1995; Haeberle, 1995; Meimarakis, 1995)

Andere Arbeiten liefern Hinweise auf anerge immunkompetente Zellen bei der Helicobacter-Infektion. Es wäre zu erwarten, dass PBMC von Helicobacter-infizierten Personen nach Antigen-Zugabe in vitro eine stärkere Aktivität zeigen als nicht-infizierte Personen, die immunologisch naiv sind, denn naive PBMC werden beim Erstkontakt nur aufgrund von Kreuzreaktionen mit ubiquitär vorhandenen bakteriellen Antigenen stimuliert. Aus mehreren Untersuchungen ist jedoch bekannt, dass PBMC von Helicobacter-infizierten Personen sogar weniger stark proliferieren als Zellen, die von nicht-infizierten Kontrollpersonen gewonnen wurden. (Karttunen, 1991; Birkholz, 1993b; Sharma, 1994) Ein ähnliches Verhalten konnte auch bei isolierten MAMC aus der Magenmukosa nachgewiesen werden. (Fan, X. J., 1994) Dies könnte bedeuten, dass bei Helicobacter-infizierten Personen einige Zellen nicht mehr in der Lage sind, auf den Sekundärkontakt mit dem Bakterium in vitro zu reagieren. Eine Proliferationsantwort konnte jedoch nach Zusatz hoher Konzentrationen von Antigen, IL-2 und akzessorischen Zellen registriert werden, was ebenfalls auf eine mögliche Anergie hindeutet, da diese durch Erhöhung der Antigen-Menge und Zugabe von akzessorischen Zellen oder Zytokinen durchbrochen werden kann. Sowohl bei PBMC

als auch bei MAMC wurde bei Patienten mit einer Helicobacter-Gastritis im Vergleich zu entzündlich veränderter Magenschleimhaut ohne Nachweis von Helicobacter eine verminderte Freisetzung von IFN- γ beobachtet. (Fan, X. J., 1994; Karttunen, 1995) Auch dies kann eine Folge von Anergie beim Sekundärkontakt mit einem Bakterium darstellen.

Ein weiterer Mechanismus, durch den eine immunsuppressive Wirkung nach einem antigenen Stimulus vermittelt werden kann, ist die Induktion von Apoptose in stimulierten Zellen. Prototyp hierfür ist die klonale Deletion von autoreaktiven T-Zellen im Thymus im Rahmen der vorgeburtlichen Entwicklung des Lymphozyten-Pools. Auch einige bakterielle Superantigene können neben der Aktivierung auch eine Inaktivierung von T-Zellen verursachen, die unter anderem durch apoptotische Vorgänge bedingt ist. Bei der Helicobacter-Infektion wurde bisher vorwiegend die Induktion von Apoptose in epithelialen Zellen im Rahmen der Pathogenese der akuten Typ B-Gastritis untersucht. Hierfür scheint unter anderem das Lipopolysaccharid von *H. pylori* verantwortlich zu sein. (Piotrowski, 1997) Es liegen jedoch auch Hinweise dafür vor, dass apoptotische Vorgänge in Zellen stattfinden, die an der Immunabwehr gegen den Keim beteiligt sind. Möglicherweise ist auch hier eine Wechselwirkung zwischen epithelialen Zellen und Lymphozyten erforderlich (Reinacher-Schick, 1998; Koyama, 2000; Dandekar, 2003) Es wurde jedoch auch gezeigt, dass innerhalb der mononukleären Zellen apoptotische Vorgänge induziert werden, die die Stärke der Inflammation modulieren könnten, (Betten, 2001) und dass die Ausheilung der Gastritis nach antibiotischer Behandlung mit dem Auftreten von Apoptose in immunkompetenten Zellen einhergeht. (Ohara, 2003)

Eine Beeinträchtigung von T-Zell-Funktionen durch Helicobacter-Proteine konnte auch unabhängig von apoptotischen Vorgängen nachgewiesen werden. So zeigten T-Lymphozyten, welche mit *H. pylori*-Sonikat kokultiviert wurden, eine verminderte Proliferationsrate auf einen definierten Stimulus, die nicht durch T-Zell-Apoptose erklärt werden konnte. Stattdessen fand sich eine verminderte Expression einer Untereinheit des T-Zell-Rezeptors (CD3-zeta). (Zabaleta, 2004) Dieser Effekt war reversibel und auf eine Arginin-Depletion durch die bakterielle Arginase zurückzuführen.

Eine verminderte Aktivität der lymphozytären Immunabwehr kann ferner durch aktive Suppressionsmechanismen vermittelt werden. Hierbei ist zunächst die T-Zell-vermittelte Suppression zu nennen, welche auch zellgebunden von einem bereits

immunologisch toleranten Organismus auf einen bezüglich des Antigens naiven Organismus übertragen werden kann. Eine Voraussetzung in solchen adaptiven Transfersystemen ist jedoch, dass die toleranten T-Zellen zusammen mit dem spezifischen Antigen in den Empfänger übertragen werden. Diese spezifische T-Zell-vermittelte Immunsuppression wurde beispielsweise bei der humanen lymphatischen Filariasis nachgewiesen. (Piessens, 1982)

Ob die humorale Immunreaktion mit Bildung Helicobacter-spezifischer Antikörper überhaupt einen relevanten Beitrag zur Abwehr einer Kolonisation des Magens durch den Erreger leisten kann, wurde in mehreren Untersuchungen in Frage gestellt. Es wurde gezeigt, dass das im Magensaft gefundene Helicobacter-spezifische IgA zum größten Teil nicht mit der sekretorischen Komponente zu sIgA verbunden war. Dies ist jedoch nötig, um die Antikörper im sauren Milieu des Magensaftes vor der Proteolyse zu schützen. Das Ausbleiben dieses Kopplungsprozesses, der normalerweise Bestandteil des rezeptorgesteuerten Transportes durch das gastrale Epithel ist, könnte durch die eingetretene Schädigung der mukosalen Barrierefunktion im Rahmen der Gastritis zu erklären sein, da in anderen Sekreten von Schleimhautoberflächen, wie z.B. im Speichel, sehr wohl intaktes spezifisches sIgA gefunden wird. (Birkholz, 1998) Andererseits war aus der Muttermilch von mit H. pylori infizierten Frauen isoliertes spezifisches sIgA in vitro gar nicht in der Lage, die Adhärenz der Bakterien an Kato-III-Zellen (einer Magenkarzinom-Zelllinie) effektiv zu verhindern. (Clyne, 1997) Adhärenz ist jedoch ein entscheidender Schritt in der Pathogenese der Helicobacter-Infektion.

Als Vermittler der von den T-Zellen ausgehenden immunsuppressiven Wirkungen können Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF- β angesehen werden. Alle drei regulieren Funktionen anderer T-Lymphozyten herab. IL-4 und IL-10 werden hauptsächlich von CD4⁺ T-Zellen produziert, die dem TH2-Subtyp angehören, und supprimieren die Expression von IL-2 und IFN- γ durch TH-1 Zellen. (de Waal Malefyt, 1991) TGF- β weist zusätzlich einen allgemeinen antiproliferativen Effekt auf Lymphozyten auf. (Sher, 1992) Alle drei Zytokine bremsen auch die Aktivität von Makrophagen, welche an der Effektor-Phase der zellvermittelten Immunität beteiligt sind.

Auch bei der *H. pylori*-Infektion konnten immunsuppressive Zytokine nachgewiesen werden. IL-4 war jedoch bei Gastritis-Patienten unabhängig davon, ob sie mit *H. pylori* infiziert waren oder nicht, in ähnlicher Höhe nachweisbar. (Karttunen, 1995)

Die Bedeutung von IL-10 für die Pathogenese der *H. pylori*-Infektion in vivo ist derzeit noch unklar. Im Biopsiematerial *H. pylori*-infizierter Personen lassen sich höhere Konzentrationen IL-10 nachweisen als in normaler nicht *H. pylori*-infizierter Schleimhaut. (Bodger, 1997) Die Expression von IL-10-mRNA ist in entzündlich veränderter Magenmukosa bei *H. pylori*-infizierten Patienten höher als bei nicht-infizierten Personen. (Karttunen, 1995; Yamaoka, 1995; Bodger, 1997)

Wenn es eine Herabregulation der zellulären Immunantwort über IL-10 gäbe, die spezifisch für den infizierenden Stamm ausgebildet wird und nicht lediglich spezie-spezifisch durch *H. pylori*-Antigene induziert wird, so müsste eine autologe Stimulation zu einer stärkeren IL-10-Ausschüttung führen. In der Tat war in der hier vorgelegten Untersuchung eine gesteigerte IL-10-Konzentration im Kulturüberstand von PBMZ bei autologer Stimulation im Vergleich zu heterologer Stimulation zu beobachten. Möglicherweise trägt dies zur verminderten Proliferation von PBMZ nach autologer *H. pylori*-Stimulation bei.

Die Tatsache, dass in einer entzündlich veränderten Mucosa, die nicht *H. pylori*-infiziert ist, IFN- γ , jedoch kein IL-10 gefunden wird, während bei der *H. pylori*-Gastritis beide Zytokine nachweisbar sind, spricht dafür, dass IL-10 nicht nur Bestandteil einer balancierten Entzündungsreaktion ist, sondern bei der *H. pylori*-Infektion gezielt exprimiert wird (Zevering, 1999). Auch bei anderen bakteriellen und parasitären Infektionskrankheiten ist eine erhöhte IL-10-Produktion nachweisbar, was mit einem verlängerten Überleben des Erregers und möglicherweise nachteiligen Auswirkungen für den Wirt verbunden ist. Bei der akuten Infektion mit *Leishmania donovani* wird IL-10 in Lymphknoten produziert. Behandelt man PBMZ dieser Patienten in vitro mit neutralisierenden Anti-IL-10-Antikörpern, resultiert eine gesteigerte Proliferation auf den Erreger (Ghalib, 1993). In einem Mausmodell der Klebsiellen-Pneumonie führt die Inhibition der IL-10-Bioaktivität in vivo zur erhöhten Expression pro-inflammatorischer Zytokine, jedoch auch zur erhöhten Clearance der Bakterien aus der Lunge und zu verlängerten Überlebensraten der infizierten Tiere (Greenberger, 1995). Auch bei parasitären Infektionen wie *Toxoplasma gondii* und *Schistosoma mansoni* konnte gezeigt werden, dass IL-10 dosisabhängig die mikrobizide Aktivität von IFN- γ -aktivierten Makrophagen inhibiert (Gazzinelli, 1992), weshalb die Induktion

von IL-10 eine wichtige Strategie von Parasiten darstellen könnte, sich den destruktiven Einflüssen des Immunsystems zu entziehen.

Andererseits findet sich auch unter den Bedingungen einer fulminanten Immunstimulation wie beim Endotoxinschock oder der entzündlichen Systemreaktion, die durch das Enterotoxin B von Staphylokokken ausgelöst wird, eine protektive Wirkung von IL-10, indem es die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ herabreguliert (Marchant, 1994; Smith, 1994).

Die Differenzierung der zellulären Immunantwort im Verlauf einer Infektion kann die klinische Ausprägung entscheidend mit beeinflussen. Im Effektorschenkel der spezifischen Immunantwort auf ein Pathogen erlaubt das von den T-Helfer-Zellen synthetisierte Zytokin-Muster eine Unterscheidung in verschiedene Subklassen, welche in ihrer polarisierten Form als TH1- und TH2-Zellen bezeichnet werden. Den TH1-Zellen kommt dabei die Hauptrolle in der Förderung zellulärer Abwehrvorgänge zu. Diese beinhaltet neben der Induktion zytotoxischer Effekte auch die Synthese von opsonierenden und komplement-aktivierenden Antikörpern. Demgegenüber wirken TH2-Zellen an der Unterhaltung der humoralen Abwehrreaktion mit, indem sie die Synthese großer Mengen von neutralisierenden Antikörpern einschließlich Mastzell-bindendem IgE induzieren. Bakterielle Pathogene führen beispielsweise in vielen Fällen über die Sekretion von IL-12 aus NK-Zellen zur Ausbildung einer TH1-dominierten Immunantwort. Ihre Effekte üben die verschiedenen T-Helferzell-Populationen dann über die Sekretion unterschiedlicher Zytokine aus.

IL-10 ist neben IL-4 und IL-5 eines der Hauptzytokine von TH2-Zellen. Die Phänotypisierung des lymphozytären Infiltrats der Lamina propria zeigte in bisherigen Untersuchungen eine Dominanz von TH1-Zellen (Bamford, 1998; Sommer, 1998). In einer anderen Untersuchung konnte zudem der Zeitverlauf einer experimentell induzierten akuten *H. pylori*-Infektion bei Rhesus-Makaken beschrieben werden (Mattapallil, 2000). Bereits nach 1 Woche kam es hier zur Expansion von CD4-Zellen in der Magenmukosa. Diese Zellen synthetisierten vorwiegend die Zytokine IL-2, IFN- γ , TNF- α und MIP-1 β und konnten somit als TH1-Zellen klassifiziert werden. Hingegen wurde nur eine geringe Produktion von IL-4 und IL-13 nachgewiesen. Auch 12 Wochen nach Infektion war dieses Zytokin-Muster unverändert nachweisbar, ohne dass eine Verschiebung in Richtung einer Th2-Immunantwort zu beobachten gewesen wäre. Aufgrund von Experimenten in einem murinen *Helicobacter-felis*-

Modell mit Transfer von spezifischen T-Zelllinien in eine TH2-defiziente IL-4-Knock-out-Maus wurde spekuliert, dass eine TH1-dominierte Entzündungsreaktion vor allem zur verstärkten inflammatorischen Reaktion in der Mukosa beitrage, während durch eine TH2-Antwort eine deutliche Reduktion der Bakterienzahl möglich sei (Mohammadi, 1997). Übertragen auf die menschliche *H. pylori*-Infektion würde dies die Befunde einer TH1-dominierten Immunreaktion mit Persistenz des Erregers und verschiedenen Schweregraden der Mukosa-Pathologie vereinbaren. Verschiedene Befunde sind jedoch mit diesem vereinfachenden Modell nicht vereinbar. Denn obwohl das TH1-Zytokin IFN- γ bei der *H. pylori*-Infektion gegenüber einer gesunden Magenschleimhaut hochreguliert wird, lässt sich im Vergleich zwischen entzündeter Mukosa und ulcerösen Krankheitsverläufen kein signifikanter Unterschied in der IFN- γ -Produktion nachweisen, der die Ulcerogenese pathophysiologisch erklären könnte (Karttunen, 1995; Lindholm, 1998). Hingegen fand sich für IL-10 eine signifikante Korrelation zum Grad der entzündlichen Veränderungen (Bodger, 1997).

Es wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der Zahl der CD4+ T-Zellen in der Lamina propria und dem Grad entzündlicher Veränderungen bei der *H. pylori*-Infektion beschrieben (Hatz, 1996). Bei Ulkus-Patienten findet sich ferner ein höherer Prozentsatz aktivierter (CD25+) CD4-Zellen als bei Patienten mit nicht-ulzeröser Dyspepsie (Ihan, 1996). Die Aktivierung von CD4-Zellen scheint somit Einflüsse auf den klinischen Verlauf der *H. pylori*-Infektion in vivo zu haben. Untersuchungen mit PBMZ liegen hierzu noch nicht vor. Bei limitierter Fallzahl konnten in dieser Untersuchung keine Unterschiede in der Häufigkeit aktivierter CD4-Zellen nach autologer oder heterologer Stimulation zwischen Ulcus- und Gastritis-Patienten gefunden werden.

Nicht nur die quantitative Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrates, sondern auch dessen zelluläre Charakteristika werden in Zusammenhang mit dem Grad der Mukosa-Schädigung gebracht. D'Elis et al. isolierten *Helicobacter*-spezifische T-Zell-Klone aus der Lamina propria von Patienten mit einer unkomplizierten Gastritis einerseits und Manifestationen einer peptischen Ulkus-Erkrankung andererseits. 82% aller Klone aus Ulkus-Patienten wiesen eine TH1-Differenzierung auf und etwa die Hälfte war spezifisch für CagA. Bei Patienten mit einer blanden Gastritis fand sich nur bei 36% der Klone eine Interleukin-Produktion, die dem TH1-Muster entsprach, 64% waren jedoch in der Lage sowohl TH1- als auch TH2-Zytokine zu synthetisieren und

wurden somit als TH0-Zellen klassifiziert. Nur wenige dieser Klone waren spezifisch für CagA. In der Regel wurden andere Epitope wie Urease, VacA oder HSP erkannt. Diese Beobachtungen können als Hinweis darauf gewertet werden, dass ein stark in Richtung TH1 polarisiertes entzündliches Infiltrat die Ulzerogenese fördert, während eine zusätzliche Expression von TH2-Zytokinen wie IL-4 und IL-5 die Ausprägung der Gastritis begrenzt. (D'Elia, 1997)

Die Bedeutung des Vorherrschens einer TH1- oder TH2-dominierten zellulären Immunantwort auf den natürlichen Verlauf der H. pylori-Infektion bleibt noch zu großen Teilen ungeklärt. Daher müssen auch die Auswirkungen einer möglichen Beeinflussung dieser Immunreaktion durch prophylaktische oder therapeutische Vakzinierung weiter erforscht werden.

Zusammenfassend konnte durch die hier durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass die autologe Stimulation von PBMZ mit vom Patienten isolierten H.pylori-Antigenen in vitro zu einer schwächer ausgeprägten Proliferationsantwort führt als dies bei heterologer Stimulation der Fall ist. Dies wird von einer gesteigerten Sekretion des Zytokins IL-10 begleitet. Unterschiede in der Expression von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche von T-Zellen ließen sich zwischen autologer und heterologer Stimulation jedoch nicht nachweisen. Die beobachteten Veränderungen in der Reagibilität des Immunsystems, die sich möglicherweise im Verlauf der Infektion ausbilden, könnten auf eine selektive Herabregulation der mukosalen Immunantwort hinweisen und in vivo dazu beitragen, dass die Infektion persistiert. Um die spezifische Beeinflussung der gastralen Entzündungsreaktion durch Helicobacter pylori weiter zu untersuchen, ist es auf Grundlage dieser Versuche für die Zukunft empfehlenswert, ein autologes Stimulationssystem zu verwenden.

5. Literaturverzeichnis

1. Aguemon B, Struelens M, Deviere J, Denis O, Golstein P, Nagy N, Salmon I (2004) Evaluation of stool antigen detection for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in adults. *Acta Clin Belg* 59: 246-50
2. Akopyants NS, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE (1992) DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 20: 5137-5142
3. Akopyants NS, Eaton KA, Berg DE (1995) Adaptive mutation and cocolonization during *Helicobacter pylori* infection of gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 63: 116-121
4. Asfeldt AM, Lochen ML, Straume B, Steigen SE, Florholmen J, Goll R, Nestegard O, Paulssen EJ (2004) Accuracy of a monoclonal antibody-based stool antigen test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 39: 1073-7
5. Aspinall GO, Monteir MA, Pang H, Walsh EJ, Moran AP (1994) O antigen chains in the lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* NCTC 11637. *Carbohydr Lett* 1: 151-156
6. Bamford KB, Fan X, Crowe SE, Leary JF, Gourley WK, Luthra GK, Brooks EG, Graham DY, Reyes VE, Ernst PB (1998) Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 114: 482-92
7. Betten A, Bylund J, Christophe T, Boulay F, Romero A, Hellstrand K, Dahlgren C (2001) A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest* 108: 1221-1228
8. Birkholz S, Knipp U, Nietzki C, Adamek RJ, Opferkuch W (1993a) Immunological activity of lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* on human peripheral mononuclear blood cells in comparison to lipopolysaccharides of other intestinal bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 6: 317-24
9. Birkholz S, Knipp U, Opferkuch W (1993b) Stimulatory effects of *Helicobacter pylori* on human peripheral blood mononuclear cells of *H. pylori* infected patients and healthy blood donors. *Zentralbl Bakteriol* 280: 166-76
10. Birkholz S, Schneider T, Knipp U, Stallmach A, Zeitz M (1998) Decreased *Helicobacter pylori*-specific gastric secretory IgA antibodies in infected patients. *Digestion* 59: 638-45
11. Blaser MJ (1992) Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology* 102: 720-7

12. Bodger K, Wyatt JI, Heatley RV (1997) Gastric mucosal secretion of interleukin-10: relations to histopathology, *Helicobacter pylori* status and tumour necrosis factor-alpha secretion. *Gut* 40: 739-744
13. Brownback PE, Barrow WW (1988) Modified lymphocyte response to mitogens after intraperitoneal injection of glycopeptidolipid antigens from *Mycobacterium avium* complex. *Infect Immun* 56: 1044-1050
14. Calvet X, Quesada M, Sanfeliu I, Salceda F, Rosello M, Montserrat A, Brullet E, Segura F (2004) Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients by stool antigen detection usefulness of a new monoclonal enzyme immunoassay test. *Dig Liver Dis* 36: 450-4
15. Claesson MH, Rudolphi A, Kofoed S, Poulsen SS, Reimann J (1996) CD4+ T lymphocytes injected into severe combined immunodeficient (SCID) mice lead to an inflammatory and lethal bowel disease. *Clin Exp Immunol* 104: 491-500
16. Clyne M, Thomas J, Weaver L, Drumm B (1997) In vitro evaluation of the role of antibodies against *Helicobacter pylori* in inhibiting adherence of the organism to gastric cells. *Gut* 40: 731-738
17. Colton C, Czinn SJ, Setrakian S, Sy M, A, Ferguson K (1995) T lymphocyte subsets in gastric tissue are altered in the presence of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 108: A800
18. Costas M, Owen RJ, Bickley JM, Morgan DR (1991) Molecular techniques for studying the epidemiology of infection by *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol* 26 Suppl 181: 20-32
19. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, al. e (1993) Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5791-5795
20. Craanen ME, Decker W, Block P, Ferweda J, Tytgat GNJ (1992) Intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori*: an endoscopic-biopic study of the gastric antrum. *Gut* 33: 16-20
21. Crabtree JE, Taylor JD, Wyatt JI, Heatley RV, Shallcross M, Tompkins DS, al. e (1991a) Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration and gastric pathology. *Lancet* 338: 332-335
22. Crabtree JE, Tompkins DS, Trejdosiewicz LK (1991b) Lymphocyte activation by *Helicobacter pylori*: effects of polymyxin B and indomethacin. *Ital J Gastroenterol* 23 (Suppl. 2): 51-52
23. Crabtree JE, Wyatt JI, Trejdosiewicz LK, Peichl P, Nichols PH, Ramsay N, al. e (1994) Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J Clin Pathol* 47: 61-66

24. D'Elia MM, Manghetti M, Almerigogna F, Amedei A, Costa F, Burroni D, Baldari CT, Romagnani S, Telford JL, Del Prete G (1997) Different cytokine profile and antigen-specificity repertoire in *Helicobacter pylori*-specific T cell clones from the antrum of chronic gastritis patients with or without peptic ulcer. *Eur J Immunol* 27: 1751-1755
25. Dandekar S, Reay E, Taylor JM, Solnick JV (2003) Apoptosis of gastric lymphocytes in *Helicobacter pylori*-infected rhesus-macaques. *Dig Dis Sci* 48: 1073-1080
26. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, de Velde A, Figdor CG (1991) Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T-cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174: 15-24
27. Ding L, Shevach EM (1994) Activation of CD4+ T cells by delivery of the B7 costimulatory signal on bystander antigen-presenting cells (trans-costimulation). *Eur J Immunol* 24: 859-866
28. Dixon MF, Wyatt JL, Burke DA, Rathbone BJ (1988) Lymphocytic gastritis-relationship to *Campylobacter pylori* infection. *J Pathol* 154: 125-132
29. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH (1995) Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 102: 448-55
30. Eurogast-Study-Group (1993) Epidemiology of and risk factors for *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. *Gut* 34: 1672-1676
31. Fan X, Crowe SE, Behar S, Gunasena H, Ye G, Haeberle H, Van Houten N, Gourley WK, Ernst PB, Reyes VE (1998) The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. *J Exp Med* 187: 1659-69
32. Fan XJ, Chua A, Shahi CN, McDevitt J, Keeling PW, Kelleher D (1994) Gastric T lymphocyte responses to *Helicobacter pylori* in patients with H pylori colonisation. *Gut* 35: 1379-84
33. Ferrero RL, Cussac V, Courcoux P, Labigne A (1992) Construction of isogenic urease-negative mutants of *Helicobacter pylori* by allelic exchange. *J Bacteriol* 174: 4212-4217
34. Forman D, Newell DG, F F, Yarnell JWG, Stacey AR, Wald N, Sitas F (1991) Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Brit Med J* 302: 1302-1305

35. Fournie JJ, Adams E, Mullins RJ, Basten A (1989) Inhibition of human lymphoproliferative response by mycobacterial phenolic glycolipids. *Infect Immun* 57: 3653-3659
36. Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A (1992) IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol* 148: 1792-6
37. Geis G, Leying H, Suerbaum S, Mai U, Opferkuch W (1989) Ultrastructure and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagella. *J Clin Microbiol* 27: 436-441
38. Geis G, Leying H, Suerbaum S, Opferkuch W (1990) Unusual fatty acid substitution in lipids and lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 28: 930-932
39. Ghalib HW, Piuvezam MR, Skeiky YAW, Siddig M, Hashim FA, El-Hassan AM, Russo DM, Reed SG (1993) Interleukin-10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest* 92: 324
40. Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM (1993) Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6586-6590
41. Greenberger MJ, Strieter RM, Kunkel SL, Danforth JM, Goodman RE, Standiford TJ (1995) Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of *Klebsiella pneumoniae*. *J Immunol* 155: 722-9
42. Gulwani AB, Akolkar PN, Minassian A, Pergolizzi R, McKinley M, Mullin G, Fisher S, Silver J (1996) Selective expansion of specific T cell receptors in the inflamed colon of Crohn's disease. *J Clin Invest* 98: 1344-1354
43. Haeberle H, Kubin M, Trinchieri G, Luthra R, Gourley WK, Garofalo R, Crowe SE, Reyes VE, Graham DY, Karttunen R, Ernst PB (1995) The regulation of activated helper T cells in the gastric mucosa during infection with *H. pylori*. *Gut* 37 Suppl. 1: A50
44. Hatz RA, Meimarakis G, Bayerdorffer E, al. e (1996) Characterization of lymphocytic infiltrates in *helicobacter pylori*-associated gastritis. *Scand J Gastroenterol* 31: 222-8
45. Holt PS, Misfeldt ML (1986) Variables which affect suppression of the immune response induced by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Infect Immun* 52: 96-100
46. Ihan A, Krizman I, Ferrlan-Marolt V, Tepez B, Gubina M (1995) HLA-DR expression on CD8 lymphocytes from gastric mucosa in urease-positive and urease-negative gastritis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 10: 295-300

47. Ihan A, Tepez B, Kavcic I, al. e (1996) IL-2 receptor expression on gastric mucosa T lymphocytes is enhanced in duodenal ulcer patients compared with non-ulcer dyspeptic patients. *Hepatogastroenterology* 43: 1665-70
48. Jones NL, Day AS, Jennings HA, Sherman PM (1999) *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell apoptosis in association with increased Fas receptor expression. *Infect Immun* 67: 4237-42
49. Kaplan G, Gandhi RR, Weinstein DE, Levis WR, Patarroyo ME, Brennan PJ, Cohn ZA (1987) *Mycobacterium leprae* antigen-induced suppression of T-cell proliferation in vitro. *J Immunol* 138: 3028-3034
50. Karttunen R (1991) Blood lymphocyte proliferation, cytokine secretion and appearance of T cells with activation surface markers in cultures with *Helicobacter pylori*. Comparison of the responses of subjects with and without antibodies to *H. pylori*. *Clin Exp Immunol* 83: 396-400
51. Karttunen R, Andersson G, Poikonen K, Kosunen TU, Karttunen T, Juutinen K, Niemela S (1990) *Helicobacter pylori* induces lymphocyte activation in peripheral blood cultures. *Clin Exp Immunol* 82: 485-8
52. Karttunen R, Karttunen T, Ekre HP, MacDonald TT (1995) Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. *Gut* 36: 341-5
53. Kato S, Nakayama K, Minoura T, Konno M, Tajiri H, Matsuhisa T, Iinuma K (2004) Comparison between the ¹³C-urea breath test and stool antigen test for the diagnosis of childhood *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol* 39: 1045-50
54. Kirchner T, Melber A, Fischbach W, Heilmann KL, Müller-Hermelink HK (1990) Immunohistological patterns of the local immune response in *Helicobacter pylori* gastritis. In: Malfertheiner P, Ditschuneit H (eds) *Helicobacter pylori*, gastritis, and peptic ulcer. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 213-222
55. Knipp U, Birkholz S, Kaup W, Mahnke K, Opferkuch W (1994) Suppression of human mononuclear cell response by *Helicobacter pylori*: effects on isolated monocytes and lymphocytes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 8: 157-166
56. Knipp U, Birkholz S, Kaup W, Opferkuch W (1993) Immune suppressive effects of *Helicobacter pylori* on human peripheral blood mononuclear cells. *Med Microbiol Immunol* 182: 63-76
57. Koyama S (2000) Apoptotic depletion of infiltrating mucosal lymphocytes associated with Fas ligand expression by *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosal epithelium: human glandular stomach as a site of immune privilege. *Dig Dis Sci* 45: 773-780
58. Leach MW, Bean AG, Mauze S, Coffman RL, Powrie F (1996) Inflammatory bowel disease in C.B-17 SCID-mice reconstituted with the CD45RB^{high} subset of CD4⁺ T cells. *Am J Pathol* 148: 1503-1515

59. Lindholm C, Quiding-Jarbrink M, Lonroth H, Hamlet A, Svennerholm AM (1998) Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect Immun* 66: 5964-71
60. Lyons SF, Friedman H (1978) Differential effects of cholera toxin pretreatment on in vitro and in vivo immunocyte responses. *Proc Soc Exp Biol Med* 157: 631-635
61. Majewski SI, Goodwin CS (1988) Restriction endonuclease analysis of the genome of *Campylobacter pylori* with a rapid extraction method: evidence for considerable genomic variation. *J Infect Dis* 157: 465-471
62. Mapstone NP, Lynch DA, Lewis FA, Axon AT, Tompkins DS, Dixon MF, Quirke P (1993) PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. *Lancet* 341: 447
63. Marchant A, Bruyns C, Vandenabeele P, Ducarme M, Gerard C, Delvaux A, De Groote D, Abramowicz D, Velu T, Goldman M (1994) Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *Eur J Immunol* 24: 1167-1171
64. Mattapallil JJ, Dandekar S, Canfield DR, Solnick JV (2000) A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques. *Gastroenterology* 118: 307-15
65. Meimarakis G, Hatz RA, Bayerdorffer E, Stolte M, Krämlin HJ, Enders GA (1995) Characterization and distribution of lymphocyte subsets in *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Clin Immunol Immunopathol* 76: S21
66. Miethke T, Wahl C, Heeg K, Wagner H (1995) Superantigens: the paradox of T-cell activation versus inactivation. *Int Arch Allergy Immunol* 106: 3-7
67. Miller RA, Gartner S, Kaplan HS (1978) Stimulation of mitogenic responses in human peripheral blood lymphocytes by lipopolysaccharide: serum and T helper cell requirements. *J Immunol* 121: 2160-2164
68. Misfeldt ML (1990) Microbial "superantigens". *Infect Immun* 58: 2409-2413
69. Mohammadi M, Nedrud J, Redline R, Lycke N, Czinn SJ (1997) Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. *Gastroenterology* 113: 1848-57
70. Muotiala A, Helander IM, Pyhala L, Kosunen TU, Moran AP (1992) Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 60: 1714-1716
71. Nedenskov-Sorensen P, Bukholm G, Bovre K (1990) Natural competence for genetic transformation in *Campylobacter pylori*. *J Infect Dis* 161: 365-366

72. Newell DG (1987) Human antibody responses to the surface protein antigens of *Campylobacter pyloridis*. *Serodiagnosis Immunother* 1: 209-217
73. Nielsen H, Andersen LP (1992) Chemotactic activity of *Helicobacter pylori* sonicate for human polymorphonuclear leucocytes and monocytes. *Gut* 33: 738-742
74. Ohara T, Kanoh Y, Higuchi K, T A, Morisita T (2003) Eradication therapy of *Helicobacter pylori* directly induces apoptosis in inflammation-related immunocytes in the gastric mucosa: possible mechanism for cure of peptic ulcer disease and MALT lymphoma with a low-grade malignancy. *Hepatogastroenterology* 50: 607-609
75. Persson U, Hammarstrom L, Moller E, Moller G, Smith CI (1978) The role of adherent cells in B and T lymphocyte activation. *Immunol Rev* 40: 78-101
76. Piessens WF, Partono F, Hoffman SL, Ratiwayanto S, Piessens PW, R PJ, Koiman J, Dennis DT, Carney WP (1982) Antigen-specific suppressor T lymphocytes in human lymphatic filariasis. *N Eng J Med* 307: 144-148
77. Piotrowski J, Piotrowski E, Skrodzka D, Slomiany A, Slomiany BL (1997) Induction of acute gastritis and epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Scand J Gastroenterol* 32: 203-211
78. Piuvezam MR, Russo DM, Burns JM, Skeiky YAW, Grabstein KH, Reed SG (1993) Characterization of responses of normal human T cells to *Trypanosoma cruzi* antigens. *J Immunol* 150: 916-924
79. Probert CS, Chott A, Turner JR, Saubermann LJ, Stevens AC, Bodinaku K, Elson CO, Balk SP, Blumberg RS (1996) Persistent clonal expansions of peripheral blood CD4+ lymphocytes in chronic inflammatory bowel disease. *J Immunol* 157: 3183-3191
80. Räsänen L, Arvilommi H (1981) Cell walls, peptidoglycans, and teichoic acids of grampositive bacteria as polyclonal inducers and immunomodulators of proliferative and lymphokine responses of human B and T lymphocytes. *Infect Immun* 31: 712-717
81. Räsänen L, Karhumaki E, Majuri R, Arvilommi H (1980) Polyclonal activation of human lymphocytes by bacteria. *Infect Immun* 28: 368-372
82. Reinacher-Schick A, Petrasch S, Burger A, Suerbaum S, Kunstmann F, Schmiegel W (1998) *Helicobacter pylori* induces apoptosis in mucosal lymphocytes in patients with gastritis. *Z Gastroenterol* 36: 1021-1026
83. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle PR, Stremmel W (1998) Diversity of *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genes and relationship to *VacA* and *CagA* protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol* 36: 944-8

84. Segal ED, Falkow S, Tompkins DS (1996) *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1259-1264
85. Sharma SA, Miller GG, Perez-Perez GI, Gupta RS, Blaser MJ (1994) Humoral and cellular immune recognition of *Helicobacter pylori* proteins are not concordant. *Clin Exp Immunol* 97: 126-132
86. Shenker BJ, McArthur WP, Tsai CC (1982) Immune suppression induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. I. Effects on human peripheral blood lymphocyte responses to mitogens and antigens. *J Immunol* 128: 148-154
87. Sher A, Gazzinelli RT, Oswald IP, Clerici M, Kullberg M, Pearce EJ, Berzovsky JA, Mosmann TR, James SL, Morse III HC, Shearer GM (1992) Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infections. *Immunological Reviews* 127: 183-204
88. Sipponen P, Varis K, Fraki O, Korri UM, Seppälä K, Siurala M (1990) Cumulative 10-year risk of symptomatic duodenal and gastric ulcer in patients with and without gastritis. A clinical follow-up of 454 patients. *Scand J Gastroenterol* 25: 966-973
89. Sitas F, Forman D, Yarnell JWG, Burr ML, Elwood PC, Pedley S, Marks KJ (1991) *Helicobacter pylori* infection rates in relation to age and social class in a population of Welsh men. *Gut* 32: 25-28
90. Smith SR, Terminelli C, Kenworthy-Bott L, Calzetta A, Donkin J (1994) The cooperative effects of TNF- α and IFN- γ are determining factors in the ability of IL-10 to protect mice from lethal endotoxemia. *Leukoc Biol* 55: 711-718
91. Sobala GM, Crabtree JE, Dixon MF, Schorah CJ, Taylor JD, Rathbone BJ, et al. (1991) Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut* 32: 1415-1418
92. Sommer F, Faller G, Konturek P, Kirchner T, Hahn EG, Zeus J, Rollinghoff M, Lohoff M (1998) Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4(+) lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. *Infect Immun* 66: 5543-6
93. Stallmach A, Schäfer F, Weber S, Hoffmann S, Müller-Molaian I, Köhne G, Ecker KW, Feifel G, Zeitz M (1998) Increased state of activation of CD4-positive T cells and elevated gamma-interferon production in pouchitis. *Gut* 43: 499-505
94. Staugas REM, Harvey DP, Ferrante A, Nandoskar M, Allison AC (1992) Induction of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) by *Pseudomonas aeruginosa* and exotoxin A-induced suppression of lymphoproliferation and TNF, lymphotoxin, gamma interferon, and IL-1 production in human leukocytes. *Infect Immun* 60: 3162-3168

95. Stolte M (1996) Pathologie der Helicobacter-pylori-Krankheiten. In: Malfetherthiner P (eds) Helicobacter pylori - von der Grundlage zur Therapie. Thieme, Stuttgart, New York, 37-62
96. Stolte M, Eidt S (1989) Lymphoid follicles in antral mucosa: immune response to Campylobacter pylori? J Clin Pathol 42: 1269-1271
97. Stolte M, Stadelmann O, Bethke B, Burkard G (1995) Relationships between the degree of Helicobacter pylori colonisation and the degree of activity of gastritis, surface epithelial degeneration and mucus secretion. Z Gastroenterol 33: 89-93
98. Syam AF, Rani AA, Abdullah M, Manan C, Makmun D, Simadibrata M, Djojoningrat D, Sato T (2005) Accuracy of Helicobacter pylori stool antigen for the detection of Helicobacter pylori infection in dyspeptic patients. World J Gastroenterol 11: 386-8
99. Taichmann NS, Dean RT, Sanderson CJ (1980) Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun 28: 258-268
100. Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M, Comanducci M, Burrone D, Bugnoli M, Tecce MF, Censini S, Covacci A, Xiang Z, Papini E, Montecucco C, Parente L, Rappuoli R (1994) Gene structure of the Helicobacter pylori cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. J Exp Med 179: 1653-1658
101. Thomas JE, Whatmore AM, Barer MR, Eastham EJ, Kehoe MA (1990) Serodiagnosis of Helicobacter pylori infection in childhood. J Clin Microbiol 28: 2641-2646
102. Tufano MA, Rossano F, Catalanotti P, Liguori G, Capasso C, Ceccarelli MT, al. e (1994) Immunobiological activities of Helicobacter pylori porins. Infect Immun 2: 1392-1399
103. Unanue ER, Allen PM (1987) The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. Science 236: 551-557
104. van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra Smid AM, Schirm J, Snijder JA (1994) Use of PCR with faeces for detection of Helicobacter pylori infections in patients. J Clin Microbiol 32: 1346-1348
105. Vincent P, F G, Pernes P, Husson MO, Lecomte Houcke M, Turck D, Leclerc H (1994) High prevalence of Helicobacter pylori infection in cohabiting children. Epidemiology of a cluster, with special emphasis on molecular typing. Gut 35: 313-316
106. Webb PM, Knight T, Greavers S, Wilson A, Newell DG, J E, Forman D (1994) Relation between infection with Helicobacter pylori and living conditions in

childhood: evidence for person to person transmission in early life. *BMJ* 308: 750-753

107. Weir DM, Blackwell CC (1983) Interaction of bacteria with the immune system. *J Clin Lab Immunol* 10: 1-12
108. Williams RC, Gibbons RJ (1972) Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin: a mechanism of antigen disposal. *Science* 177: 697-699
109. Wyatt JL, Rathbone BJ (1988) Immune response of the gastric mucosa to *Campylobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 142: 44-49
110. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, al. e (1995) Expression of cytokine mRNA in gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 30: 1153-9
111. Yoshida N, Granger DN, Evans DJ, Evans DG, Graham DY, Anderson DC, al. e (1993) Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology* 105: 1431-1440
112. Zabaleta J, McGee DJ, Zea AH, Hernández CP, Rodriguez PC, Sierra RA, Correa P, Ochoa AC (2004) *Helicobacter pylori* Arginase inhibits T cell proliferation and reduces the expression of the TCR zeta-chain (CD3zeta). *J Immunol* 173: 586-593
113. Zeitz M (1997) Pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Digestion* 58 (Suppl. 1): 59-61
114. Zevering Y, Jacob L, Meyer TF (1999) Naturally acquired human immune responses against *Helicobacter pylori* and implications for vaccine development. *Gut* 45: 465-74

8. Publikation und Dank

Die wesentlichen Ergebnisse der vorgestellten Arbeit wurden veröffentlicht in:

Jakob B, Birkholz S, Schneider T, Duchmann R, Zeitz M, Stallmach A (2001)
Immune response to autologous and heterologous Helicobacter antigens in humans.
Microscopy Research and Technique 53: 419-424

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Stallmach und Frau Dr. rer. nat. Sabine Birkholz danke
ich für die Überlassung des Themas und die engagierte Beratung zu den
Experimenten und der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Frau Baus-Kettl (MTA) bin ich für ihre gewissenhafte Begleitung und Unterstützung
bei der technischen Durchführung der Experimente zu Dank verpflichtet.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jakob
Vorname	Benjamin
Geburtsdatum, -ort	12.11.1972, Ludwigshafen/Rh.
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung

1978 - 82	Grundschule Ludwigshafen-Ruchheim
1982 - 85	Max-Planck-Gymnasium, Ludwigshafen/Rhein
1985 - 91	Goethe-Gymnasium, Regensburg
10.7.1991	Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

1991 - 97	Medizinstudium an der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
30.10.97	Abschluss der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

1.1.98 – 30.6.99	AiP in der Klinik für Gastroenterologie der Universitätsklinik Heidelberg (Prof. Dr. W. Stremmel)
1.7.99 – 30.9.04	Weiterbildung an der Klinik für Innere Medizin II (Prof. Dr. M. Zeitz, komm. Dir. Prof. Dr. H. Köhler, Prof. Dr. S. Zeuzem) der Uniklinik des Saarlandes, Homburg/Saar
Seit 1.10.2004	Assistenzarzt am Städt. Krankenhaus Pirmasens gGmbH, Abt. Innere Medizin (Gastroenterologie und Diabetologie), Chefarzt Dr. K. Stuby,
15.11.2004	Facharztprüfung Innere Medizin